



**KAVUN TOHUMLARINDAN ELDE EDİLEN ÜREAZ
ENZİMİ KULLANILARAK KUM BİR ZEMİNİN ENZİM
ARACILI KALSİT ÇÖKELMESİ İLE
İYİLEŞTİRİLMESİ**

Hamayoun SAKHAİ

Doç. Dr. Semet ÇELİK
Yüksek Lisans Tezi
İnşaat Mühendisliği Ana Bilim Dalı
2022
(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İNŞAAT MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

**KAVUN TOHUMLARINDAN ELDE EDİLEN ÜREAZ ENZİMİ KULLANILARAK
KUM BİR ZEMİNİN ENZİM ARACILI KALSİT ÇÖKELMESİ İLE
İYİLEŞTİRİLMESİ**

Improvement of a Sand Soil by Enzyme Induced Carbonate Precipitation (EICP) Using
Urease Enzyme Extracted from Melon Seeds

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hamayoun SAKHAİ

Danışman: Doç. Dr. Semet ÇELİK

Erzurum
Eylül, 2022



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

KAVUN TOHUMLARINDAN ELDE EDİLEN ÜREAZ ENZİMİ KULLANILARAK KUM BİR
ZEMİNİN ENZİM ARACILI KALSİT ÇÖKELMESİ İLE İYİLEŞTİRİLMESİ

Doç. Dr. Semet ÇELİK danışmanlığında, Hamayoun SAKHAİ tarafından hazırlanan bu çalışma,
09/09/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından İnşaat Mühendisliği Anabilim Dalı Geoteknik
Bilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Neşe KURT ALBAYRAK <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.
Danışman:	Doç. Dr. Semet ÇELİK <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Harun AKOĞUZ <i>Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.

Enstitü Yönetim
Kurulunun .../.../.... tarih
ve sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili
maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü
Aslı Islak İmzalıdır.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak
kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek lisans Tezi olarak Doç. Dr. Semet ÇELİK danışmanlığında sunulan “Kavun Tohumlarından Elde Edilen Üreaz Enzimi Kullanılarak Kum Bir Zeminin Enzim Aracılı Kalsit Çökmesi ile İyileştirilmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	0	30
Kuramsal Temeller	6	30
Materyal ve yöntem	6	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	4	20
Sonuçlar ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	6	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Hamayoun SAKHAİ	Doç. Dr. Semet ÇELİK
15.9.2022	15.9.2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır.	İmza: Aslı Islak İmzalıdır.

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamın tüm aşamalarında bilgi, birikim ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Semet ÇELİK’e teşekkür eder, saygı ve minnetlerimi sunarım.

Tez çalışmamda gerek deneysel çalışmalarda gerek malzeme temininde desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Özlem BARIŞ ve deneysel çalışmalarında yardımlarından dolayı Sayın Arş. Gör. Özlem GÜLMEZ’e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi İnşaat Mühendisliği Bölümü Zemin Mekaniği ve Geoteknik Mühendisliği Laboratuvarı, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarları ve DAYTAM Laboratuvarlarında yürütülmüştür. Belirtilen kurumların başkanlığına ve kıymetli personeline teşekkürü bir borç bilirim.

Diğer taraftan sadece bu çalışma sürecinde değil, tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme şükranlarımı sunarım.

Hamayoun SAKHAİ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KAVUN TOHUMLARINDAN ELDE EDİLEN ÜREAZ ENZİMİ KULLANILARAK KUM BİR ZEMİNİN ENZİM ARACILI KALSİT ÇÖKELMESİ İLE İYİLEŞTİRİLMESİ

Hamayoun SAKHAİ

Danışman: Doç. Dr. Semet ÇELİK

Amaç: Tez çalışmasında, ticari üreaz yerine kavun tohumlarından elde edilen üreaz enzimi kullanılarak kötü derecelenmiş bir kum zeminin (SP) enzim aracılı kalsit çökeltmesi (EICP) ile iyileştirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmada kullanılan üreaz yerli kavun tohumlarından elde edilmiş, aktivitesi Nessler yöntemi ile ve üreaz aktivitesini etkileyen parametre seviyeleri Taguchi optimizasyon metodu ile belirlenmiştir. Zeminlere uygulanacak optimum EICP çözeltisini elde etmek için Taguchi deney tasarımı kullanılarak kalsiyum karbonat çökeltme deneyi yapılmış ve farklı kalsiyum kaynakları ve magnezyum klorürün kalsiyum karbonat çökeltmesi üzerindeki etkileri çökeltme deneyleri ve XRD analizi yapılarak araştırılmıştır. Farklı kalsiyum kaynakları ve magnezyum katkılarından oluşan çözeltiler SP zeminlere uygulanarak serbest basınç deneyi, kalsiyum karbonat içeriği deneyi, SEM ve EDX analizleri yapılmıştır.

Bulgular: Kavun tohumlarının üreaz aktivitesi, 0,352 U/mL ile 59,905 U/mL aralığında belirlenmiş ve en etkili parametrenin inkübasyon zamanı olduğu görülmüştür. Yapılan çökeltme deneyleri sonucunda, en yüksek çökeltme oranı 1 mol/L üre, 0,6 mol/L kalsiyum klorür ve 100 g/L üreazdan oluşan EICP çözeltisinden % 25,85 olarak elde edilmiştir. EICP uygulama çözeltisinde farklı kalsiyum kaynakları kullanılarak yapılan iyileştirmeler sonucunda, en yüksek serbest basınç mukavemeti 203 kPa olarak bulunmuştur. Uygulama çözeltisinde kalsiyum klorür kullanılarak iyileştirilen numunenin mukavemeti, diğer numunelerden daha yüksek çıkmıştır. Deneyler sonucunda oluşan yapıların kalsit olduğu XRD, SEM ve EDX analizleri ile tespit edilmiştir.

Sonuç: Yapılan deneyler sonucunda kavun tohumlarından elde edilen üreazın, kalsiyum kalsit çökeltmesi için mevcut ticari üreaz yerine kullanım potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Enzim aracılı kalsit çökeltmesi uygulanarak yapılan zemin iyileştirmesi sonucunda oluşan kalsit, zeminlerin mukavemetini artırmıştır.

Anahtar Kelimeler: Zemin iyileştirme, EICP, Biyo-aracılı zemin iyileştirme, kalsit, üreaz enzim, Taguchi yöntemi

Eylül 2022, 99 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

IMPROVEMENT OF A SAND SOIL BY ENZYME INDUCED CARBONATE PRECIPITATION (EICP) USING UREASE ENZYME EXTRACTED FROM MELON SEEDS

Hamayoun SAKHAI

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Semet ÇELİK

Purpose: In the thesis study, it was aimed to improve a poorly graded sand soil (SP) by enzyme induced carbonate precipitation (EICP) by using urease enzyme obtained from melon seeds instead of commercial urease.

Method: The urease used in the study was obtained from local melon seeds, its activity was determined by the Nessler method and the parameter levels affecting the urease activity were determined by the Taguchi optimization method. In order to obtain the optimum EICP solution to be applied to the soils, a calcium carbonate precipitation test was carried out using the Taguchi experimental design and the effects of different calcium sources and magnesium chloride on the calcium carbonate precipitation were investigated by performing precipitation tests and XRD analysis. Unconfined compression test, calcium carbonate content test, SEM and EDX analyzes were carried out by applying solutions consisting of different calcium sources and magnesium additives to SP soils.

Findings: The urease activity of melon seeds was determined between 0.352 U/mL and 59.905 U/mL, and it was seen that the most effective parameter was the incubation time. As a result of the precipitation experiments, the highest precipitation rate was obtained as 25.85% from the EICP solution consisting of 1 mol/L urea, 0.6 mol/L calcium chloride and 100 g/L urease. As a result of the improvements made by using different calcium sources in the EICP application solution, the highest unconfined compressive strength was found to be 203 kPa. The strength of the sample improved by using calcium chloride in the application solution was higher than the other samples. It has been determined by XRD, SEM and EDX analyzes that the structures formed as a result of the experiments are calcite.

Results: As a result of the experiments, it was concluded that urease obtained from melon seeds has the potential to be used instead of existing commercial urease for calcite precipitation. Calcite formed as a result of soil improvement by applying enzyme induced carbonate precipitation increased the strength of the soils.

Keywords: Soil improvement, EICP, Bio-mediated soil improvement, calcite, urease enzyme, Taguchi method

September 2022, 99 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	3
Zeminlerin İyileştirilmesi ve Uygulanan Teknikler	3
Katkısız zemin iyileştirme.....	4
Katkılı zemin iyileştirme.....	4
Kalsit (CaCO_3) Çökmesi İle Zeminlerin İyileştirilmesi.....	5
Mikrobiyal Aracılı Kalsit Çökmesi (MICP) İle Zeminlerin İyileştirilmesi	8
Enzim Aracılı Kalsit Çökmesi (EICP) Yoluyla Zeminlerin İyileştirilmesi	11
EICP tekniğinin zeminlere uygulanması.....	11
Enzim ve Üreaz Enzim.....	14
Üreaz Enzimin Aktivitesi ve Ölçümü	16
Taguchi Yöntemi.....	18
Literatür Özetleri.....	21
MATERYAL VE YÖNTEM	30
Materyal	30
Deneylerde kullanılan kumun özellikleri	30
Deneylerde kullanılan çözeltiler	31
Yöntem.....	32
Üreaz enziminin ekstraksiyonu	33
Üreaz aktivitesi tayini ve optimizasyonu	35
Kalsiyum karbonat çökme (tüp) deneyi	39
Kalsiyum kaynağı ve MgCl_2 'ün kalsiyum karbonat çökmesi üzerindeki etkileri.....	41
Zemin numunelerin hazırlanması ve uygulama yönteminin seçimi	42
Serbest basınç deneyi	46

EICP uygulanmış zeminlerde kalsiyum karbonat içeriğinin belirlenmesi	47
XRD (X-Işınları kırınımı) Analizi	47
SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) analizi	48
SEM analizi ile yüksek büyütmelede yüzey görüntüsü alabilmenin yanında malzemenin topografyası ve kimyasal kompozisyonu hakkında da bilgi edinilebilmektedir. Uygulama yapılan ve yapılmayan zeminlerin SEM görüntüleri DAYTAM’da yapılmıştır.....	48
EDX (Enerji Dağılımlı X-Işını Spektrometresi) analizi.....	48
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	49
Üreaz Aktivitesi Sonuçları	49
Kalsiyum Karbonat Çökelme (Tüp) Deneyi Sonuçları.....	55
Kalsiyum kaynağı ve MgCl ₂ ’ün kalsiyum karbonat çökmesi üzerindeki etkileri.....	59
Serbest Basınç Deneyi Sonuçları	63
EICP uygulanmış zeminlerde kalsiyum karbonat içeriği sonuçları	68
SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Analiz Sonuçları	70
EDX (Enerji Dağılımlı X-Işını Spektrometresi) Analiz Sonuçları	72
SONUÇ ve ÖNERİLER	76
KAYNAKLAR.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	84

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. EICP İle Yapılan Bazı Çalışmalarda Kullanılan Bitki Üreaz Enzim Kaynakları.....	16
Tablo 2. Üreaz Aktivitesi Tayin Yöntemleri	17
Tablo 3. L25 Ortogonal Dizin.....	19
Tablo 4. Deneylerde Kullanılan Kum Zeminin İndeks Özellikleri.....	30
Tablo 5. Üreaz Aktivitesi Tayini İçin Belirlenen Parametreler ve Seviyeleri	36
Tablo 6. Üreaz Aktivitesi Tayini İçin Taguchi Metodu İle Belirlenen L25 Ortogonal Dizin	36
Tablo 7. Amonyum Klorür (NH ₄ Cl) Standart Çözeltilerinin Hazırlanması	38
Tablo 8 . Kalsiyum Karbonat Çökelme Deneyi İçin Seçilen Parametreler ve Seviyeleri	39
Tablo 9. Kalsiyum Karbonat Çökelme Deneyi İçin Belirlenen L25 Ortogonal Dizin	40
Tablo 10. Çökelme Deneyleri İçin Deney Programı	42
Tablo 11. Zemin Numunelere Uygulanan EICP Uygulama Çözeltilerin İçeriği.....	43
Tablo 12. Üreaz Aktiviteleri ve Performans İstatistiği (S/N) Oranları.....	49
Tablo 13. Üreaz Enzim Aktivitesi İçin Parametrelerin Ortalama S/N Etki Oranları.....	50
Tablo 14. Parametrelerin Üreaz Aktivitesi İçin Varyans Analiz Sonuçları.....	53
Tablo 15. Parametrelerin Üreaz Enzim Aktivitesi İçin Havuzlama (pooling) Sonrası Varyans Analiz Sonuçları	54
Tablo 16. Üreaz Aktivitesinin Performans Tahmin Değerleri.....	54
Tablo 17. Kalsiyum Karbonat Çökelme Deney Sonuçları ve Performans istatistiği (S/N) Oranları	55
Tablo 18. Kalsiyum Karbonat Çökelme Oranı İçin Parametrelerin Ortalama S/N Etki Oranları	56
Tablo 19. Parametrelerin Çökelme Oranları İçin Varyans Analiz Sonuçları	58
Tablo 20. Çökelme Oranların Performans Tahmin Değerleri	58
Tablo 21. Farklı Kalsiyum Kaynakları ve Magnezyum Klorür Kullanılarak Yapılan Çökelme Deneyi Sonuçları	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kalsiyum karbonat çökmesinin şematik gösterimi	6
Şekil 2. Karbonat (CO_3)'ün deniz suyunda pH'a karşı türleşmesi	7
Şekil 3. Mikroorganizmada oluşan üre enzim aktivitesi tarafından başlatılan kalsiyum karbonat çökeltisi mekanizması (B) Bütün hücrenin kapsüllenmesi. (C) Kalsiyum karbonat çökmesinin sonlanması.....	8
Şekil 4. EICP sürecinin zeminde şematik gösterimi	13
Şekil 5. Jack Bean Fasulyesi'nin (<i>Canavalia ensiformis</i>) üreaz enziminin üç boyutlu yapısı	14
Şekil 6. Kum zemine ait granülometri eğrisi.....	30
Şekil 7. Aseptik ortam.....	31
Şekil 8. Deneysel çalışmada kullanılan kimyasallar	32
Şekil 9. Üreaz-üre çözeltisinin pH'ın zamanla değişimi	34
Şekil 10. Üreaz enzim çözeltisinin hazırlama aşamaları	35
Şekil 11. Üreaz aktivite tayininde kullanılan Spektrofotometre aleti	37
Şekil 12. 0-10 mg/mL içeren örneklerin amonyum analizi için kalibrasyon eğrisi	38
Şekil 13. Kalsiyum karbonat çökme deneyi için prosedür	41
Şekil 14. Uygulamada kullanılan zemin ve PVC kalıpları.....	43
Şekil 15. Birinci yönteme kullanılan deney düzeneği	44
Şekil 16. Birinci yöntemin görselleri: (a) Üre- CaCl_2 ve üreaz enzim çözeltisi, (b) uygulama çözeltisi (c) uygulama çözeltisi verilen numuneler, (d) iyileştirilen numuneler.....	44
Şekil 17. İkinci yöntemin görselleri: (a) uygulamadan sonra kurutulmuş numune, (b) ve (c) kalıplardan çıkarılan numuneler	45
Şekil 18. Süzülme yönteminin uygulandığı numunelerin görselleri	46
Şekil 19. Serbest basınç deney aleti	47
Şekil 20. Enzim konsantrasyonu, karıştırma süresi, santrifüj süresi, sıcaklık ve inkübasyon zamanı parametrelerinin üreaz enzim aktivitesi üzerine etkileri	52
Şekil 21. Üre, enzim konsantrasyonu ve kür süresinin kalsiyum karbonat çökme oranları üzerine etkileri.....	57
Şekil 22. Farklı kalsiyum kaynakları kullanılarak yapılan çökme deneyleri sonucunda oluşan yapılara ait XRD analiz sonuçları (devamı)	60
Şekil 22. Farklı kalsiyum kaynakları kullanılarak yapılan çökme deneyleri sonucunda oluşan yapılara ait XRD analiz sonuçları.....	61

Şekil 23. Magnezyum katkılı çözeltilerin (0,575 CaCl ₂ + 0,075 MgCl ₂ ve 0,45 CaCl ₂ + 0,15MgCl ₂) çökelme deneyleri sonucunda oluşan yapılara ait XRD analiz sonuçları	62
Şekil 24. Magnezyum katkılı çözeltilerin (0,375 CaCl ₂ + 0,225 MgCl ₂ ve 0,3 CaCl ₂ + 0,3MgCl ₂) çökelme deneyleri sonucunda oluşan yapılara ait XRD analiz sonuçları	63
Şekil 25. Optimum EICP uygulama çözeltisi ile iyileştirilen zeminin eksenel gerilme – eksenel birim deformasyon grafiği	64
Şekil 26. Kalsiyum klorür içeren EICP çözeltisi uygulanan numune ve serbest basınç deneyine ait görsel	64
Şekil 27. Kalsiyum nitrat içeren EICP uygulama çözeltisi ile iyileştirilen zeminin eksenel gerilme – eksenel birim deformasyon grafiği	65
Şekil 28. Kalsiyum nitrat içeren EICP çözeltisi uygulanan numune ve serbest basınç deneyine ait görsel	65
Şekil 29. Kalsiyum asetat içeren EICP uygulama çözeltisi ile iyileştirilen zeminin eksenel gerilme – eksenel birim deformasyon grafiği	66
Şekil 30. Kalsiyum asetat içeren EICP çözeltisi uygulanan numune ve serbest basınç deneyine ait görsel	66
Şekil 31. Magnezyum klorür katkılı EICP çözeltisi uygulanan numunelere ait görseller	68
Şekil 32. EICP uygulama çözeltileri uygulanan numunelerinin ortalama kalsiyum karbonat içeriği	69
Şekil 33. Uygulama yapılmayan kum zemine ait SEM analiz görseli (a) 5000 x (b) 10000 x yakınlaştırma	70
Şekil 34. Kalsiyum klorür içeren optimum EICP çözeltisi uygulanan zemin numunesine ait SEM analiz görseli (a) 5000 x (b) 20000 x yakınlaştırma	71
Şekil 35. Kalsiyum nitrat içeren EICP çözeltisi uygulanan zemin numunesine ait SEM analiz görseli (a) 5000 x (b) 10000 x yakınlaştırma	71
Şekil 36. Kalsiyum asetat içeren EICP çözeltisi uygulanan zemin numunesine ait SEM analiz görseli (a) 5000 x (b) 10000 x yakınlaştırma	72
Şekil 37. Magnezyum katkılı EICP çözeltisi (0,375 CaCl ₂ + 0,225 MgCl ₂) uygulanan zemin numunesine ait SEM analiz görseli (a) 5000 x (b) 10000 x yakınlaştırma	72
Şekil 38. Uygulama yapılmayan kum zemin numunesine ait EDX analiz sonuçları	73
Şekil 39. Kalsiyum klorür içeren (optimum) EICP çözeltisi uygulanan zemin numunesine ait EDX analiz sonuçları	73

Şekil 40. Kalsiyum asetat içeren EICP çözeltisi uygulanan zemin numunesine ait EDX analiz sonuçları	74
Şekil 41. Kalsiyum nitrat içeren EICP çözeltisi uygulanan zemin numunesine ait EDX analiz görseli	74
Şekil 42. Magnezyum klorür katkı EICP çözeltisi ($0,375 \text{ CaCl}_2 + 0,225 \text{ MgCl}_2$) uygulanan zemin numunesine ait EDX analiz görseli	75



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µL	: Mikro litre
µmol	: Mikromolar
Abs	: Absorbans değerleri
ASTM	: American Society fot Testing and Materials
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CaCO ₃	: Kalsiyum karbonat
CH	: Yüksek plastisiteli kil
CL	: Düşük plastisiteli kil
cm	: Santimetre
DAYTAM	: Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi
dk	: Dakika
EDX	: Enerji Dağılımlı X-Işını Spektrometresi Enerji dağılım x-ışını
EICP	: Kalsit aracılı kalsit çökmesi
et al	: Ve diğerleri
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
Kg	: Kilogram
kPa	: Kilopaskal
m	: Metre
M	: Molar
mg	: Miligram
MICP	: Mikrobiyal aracılı kalsit çökmesi
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
MPa	: Mega paskal
nm	: Nanometre
pH	: Suyun asit ve alkalitesini anlatan logaritmik ölçü birimi
rpm	: Dakikada devir sayısı
SC	: Killi kum
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SM	: Siltli kum

SP	: Kötü derecelenmiş kum zemin
UCS	: Serbest basınç mukavemeti
USCS	: Birleştirilmiş zemin sınıflandırma sistemi
V _v	: Hacim
W _w	: Kütle
XRD	: X-ray kırınımı



GİRİŞ

Bazen inşaat projelerinin yapımı için önceden düşünülen alan geoteknik özellikleri açısından uygun olmadığı halde kullanmak zorunda kalınabilir. Bu tür durumlarda zemin iyileştirmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Zayıf zeminler için iyileştirme yöntemlerinin kullanılması, zeminin mukavemetini artırarak üzerine inşa edilen yapıların güvenliğini sağlamaktadır. Zeminlerin iyileştirmesinde, drenaj, taş kolonlar, vibroflotasyon, dinamik kompaksiyon ve kimyasal katkı maddeler (Portland çimentosu, kireç, bitüm vb.) gibi çeşitli yöntemler yaygın olarak uygulanmaktadır. Zemin iyileştirme yöntemlerinin çoğu, tipik olarak zeminlere mekanik enerjinin uygulanmasıyla zeminlerin sıkıştırılmasını içerir. Zeminlerin sıkıştırılması, işletme ve kurulum prosedürleri için önemli miktarda enerji tüketirken, kimyasal katkı maddeler ile zemin iyileştirme yöntemleri yalnızca sıkıştırma için değil, aynı zamanda çevresel sorunlara yol açabilecek enjeksiyon işlemi için de enerji gerektirir (DeJong *et al.* 2010). Zemin iyileştirme için kullanılan en popüler kimyasal katkı maddesi, hidrolik iletkenliği azaltmanın yanı sıra kumların mekanik özelliklerini iyileştirmek için Portland çimentosunun kullanılmasıdır. Ancak, Portland çimentosunun kullanımı, üretimi son derece yüksek enerji gerektiği için ekonomik açıdan maliyetli ve zaman alıcıdır. Ayrıca, çimento önemli bir karbondioksit (CO₂), kükürt dioksit (SO₂) ve azot oksit emisyonu kaynağı olduğundan zemin iyileştirmede kullanılması durumunda küresel ısınmaya neden olmaktadır. Dolayısıyla geoteknik mühendisleri, zemin iyileştirmede kimyasalların ve çimentonun kullanımını azaltmak ve maliyetleri düşürmek için son 15 yıldır yeni ve sürdürülebilir bir konu olan biyo-aracılı zemin iyileştirme tekniklerini araştırmaya ve geliştirmeye çalışmaktadırlar.

Bu biyo-aracılı yöntemler doğadan esinlenmiş olup, mikrobiyal aracılı kalsit çökmesi (MICP) ve enzim aracılı kalsit çökmesi (EICP) tekniği olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir. Bu teknikler, birçok zemin iyileştirme uygulaması için Portland çimentosuna sürdürülebilir alternatif zemin iyileştirme tekniği olarak bilinir ve diğer mevcut yöntemlere göre zemine uygulama sırasında daha az karbon emisyonu açığa çıkarır (Kavazanjian *et al.* 2017; Ross 2018).

EICP ve MICP kullanılarak zeminde kalsit çökmesi, üre hidrolizi adı verilen bir dizi kimyasal reaksiyon süreciyle gerçekleşmektedir. Zeminde oluşan kalsit, zemin partikülleri arasında bulunan boşlukları doldurarak zemin tanelerinin birbirine bağlanmasını sağlar ve böylece geçirimsizliği azaltarak zeminin mukavemetini artırır. Her iki zemin iyileştirme

teknğinde de reaksiyonlar, üre ve kalsiyum klorür çözeltisine üre hidrolizinin reaksiyonu için bir katalizör görevi gören üreazın eklenmesi ile gerçekleşmektedir. MICP zemin iyileştirme tekniğinde üreaz kaynağı olarak ürolitik bakteriler kullanılırken EICP tekniğinde ise bitkilerden üretilen üreaz kullanılmaktadır. MICP, granüler zeminlerin iyileştirilmesi için yaygın olarak kullanılan bir biyo-aracılı tekniği olmasına rağmen üreaz kaynağı olarak bakterilerin kullanmasından dolayı ince taneli ve derin zeminlere uygulanabilirliği ve uygulama maliyeti açısından bazı sınırlamaları mevcuttur (Dilrukshi and Kawasaki 2016).

Son yıllarda, EICP ile zemin iyileştirme konusunda yapılan çalışmalar artış göstermektedir. EICP ilgili çalışmaların çoğunda üreaz kaynağı olarak Jack Bean bitkisinden üretilen ticari üreaz kullanılmıştır. Ancak ticari üreaz tıp, gıda ve biyomedikal laboratuvarlarında kullanılmak üzere üretilmektedir. Dolayısıyla ticari üreaz EICP uygulamasının toplam maliyetinin %57-%98'ini oluşturmaktadır. Ticari üreazın yüksek maliyeti büyük ölçekli zemin iyileştirme uygulamalarda uygun olmayabilir (Almajed *et al.* 2021). Bu nedenle, yapılan son çalışmalarda ticari üreaz enziminin maliyetini düşürmek için üreaz enzim Jack fasulyesi, karpuz tohumları ve soya fasulyesi gibi bitkilerden laboratuvar ortamında ham ekstrakt olarak elde edilmiştir. Elde edilen ham ekstrakt kullanılarak EICP ile yapılan zeminlerin iyileştirmesinden önemli sonuçlar alınmıştır (Nam *et al.* 2015; Dilrukshi *et al.* 2018; Lee and Kim 2020).

Bu tez çalışmasında, ticari üreaz yerine kavun tohumlarından elde edilen üreaz enzimi kullanılarak kum bir zeminin enzim aracılı kalsit çökmesi ile iyileştirilmesi amaçlanmıştır. Kavun tohumunun üreaz aktivitesi, Taguchi deney tasarımı uygulanarak Nessler yöntemi ile belirlenmiş ve üreaz aktivitesini etkileyen parametreler araştırılmıştır. Zeminlere uygulanacak optimum EICP çözeltisini belirlemek üzere Taguchi metodu kullanılarak çökme deneyleri yapılmıştır. Farklı kalsiyum kaynakları ve magnezyum klorürün kalsiyum karbonat çökmesi üzerindeki etkileri yapılan çökme deneyi ve XRD analizi ile belirlenmiştir. Farklı kalsiyum kaynakları ve magnezyum içeren EICP çözeltileri kötü derecelenmiş kum (SP) bir zemine uygulanmıştır. İyileştirilmiş numuneler üzerinde serbest basınç deneyi ve kalsit içeriği deney yapılmıştır. Ayrıca, iyileştirme sonucunda zeminlerde oluşan yapılar SEM ve EDX analizleri ile ortaya konulmuştur.

KURAMSAL TEMELLER

Zeminlerin İyileştirilmesi ve Uygulanan Teknikler

Bir inşaat sahasındaki zemin, her zaman doğal haliyle yapılması planlan mühendislik projesinin gereksinimlerini karşılamayabilir ve bazı durumlarda projenin yapılabilirliğini tayin edecek kadar problemli olabilmektedir. Böyle durumlarda taşıma kapasitesini artırmak ve beklenen oturmaya azaltarak zeminin mühendislik özelliklerinin iyileştirilmesi gerekecektir. Zemin iyileştirmesi, yapılması planlanan mühendislik uygulamalarına göre zeminlerin belirli özelliklerinin fiziksel, kimyasal ya da biyolojik yöntemler kullanılarak iyileştirilmesi olarak tanımlanabilir (Özaydın 2012).

Bir proje sahasında problemli veya zayıf zemin koşulları ile karşılaşıldığı zaman aşağıdaki alternatif çözümlere başvurulabilir (Nicholson 2014):

- Projede değişikliklere gidilmesi ve daha uygun inşaat alanının bulunması
- Mevcut zayıf zeminin taşıma kapasitesi yüksek bir zeminle değiştirilmesi
- Taşıma kapasitesi zayıf zeminleri temellerin daha sağlam zeminlere oturtulması
- Zeminin özelliklerinin yerinde zemin iyileştirme yöntemleri kullanılarak iyileştirilmesi.

Zemin iyileştirilmesinin amacı zayıf zeminlerin yapıdan gelen yükleri güvenli bir şekilde taşıyabilmesi için mühendislik özelliklerini iyileştirmektir. Genellikle zemin iyileştirilmesinde amaçlananlar:

- Taşıma kapasitesini artırılması,
- Yapıdan gelen yük altında meydana gelebilecek oturmaların azaltılması,
- Drenaja izin vermek için geçirimsizliği artırılması,
- Deprem yükü altında sıvılaşma potansiyelini azaltmak sayılabilir.

Son 50 yıl içerisinde birçok farklı zemin iyileştirme yöntemi geliştirilmiş ve yeni yerleşim yerleri oluşturmak için bu teknikler daha da geliştirilerek revize edilmiştir. Aşağıda bazı zemin iyileştirme teknikleri özet olarak verilmiştir.

Katkısız zemin iyileştirme

Bu zemin iyileştirme yönteminde herhangi bir katkı malzemesi kullanmadan mekanik olarak zemin iyileştirilir. Katkısız zemin iyileştirme yöntemi, kompaksiyon, zemin değiştirme, ön konsolidasyon ve taş kolonlar gibi birçok zemin iyileştirme yöntemi kullanılarak yapılabilir.

Kompaksiyon; nemli zeminin, tabaka tabaka (0,2 m-0,4 m gibi) serilerek, silindirme, vibrasyon uygulama ve tokmaklama gibi işlemler ile sıkıştırılmasına kompaksiyon denilir (Uzuner 2016). Kompaksiyon, zemin mukavemetinin artmasına, oturmaların azalmasına, drenaj ve geçirimsizlik koşullarının uygun hale gelmesinde etkili bir yöntemdir (Al 2018).

Zemin değiştirme; taşıma gücü zayıf olan, yüksek oturma beklenen, mevcut yumuşak zeminin mühendislik özellikleri iyi olan kum veya çakıl gibi malzemeler ile değiştirmesi yöntemidir.

Ön konsolidasyon; bu yöntem ile geçirimsizliği düşük kil zeminlerde inşa edilecek yapının konsolidasyon oturmasını azaltmak için yapı inşa edilmeden önce üzerine yapılacak yapının yükünden daha fazla bir yüke maruz bırakılarak zeminin konsolide olması sağlanır.

Taş kolonlar; taş kolonlar, kohezyonlu zeminlerin kayma mukavemetini arttırmak, aşırı oturmaları azaltmak ve gözenek suyu akışı için yatay drenaj yollarını kısaltarak konsolidasyonu hızlandırmak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Wang 2009).

Katkılı zemin iyileştirme

Çeşitli katkı malzemelerin veya harçların zemin ile karıştırılarak yapılan zemin iyileştirme yöntemidir. Bazı katkılı zemin iyileştirme yöntemleri aşağıda verilmiştir.

Çimento ile iyileştirme; pratik amaçlar için, çimento granüler zeminlerde etkili ve ekonomik bir yöntemdir. Bununla birlikte, çimento ile zemin iyileştirmede, özellikle zemin ıslak ise ve aşırı büzülme söz konusu olduğunda, çimentonun yüksek dozaj gereklilikleri ve karıştırma zorlukları nedeniyle ince taneli zeminler için çok uygun olmayabilir. En iyi çimento ile iyileştirme, az miktarda silt veya kil içeren çakıllı zeminler ve kumlar gibi iyi derecelenmiş granüler zeminlerde yapılabilir (Nicholson 2014).

Kireç ile iyileştirme; kohezyonlu zeminlere kireç karıştırılarak puzolanik reaksiyon oluşturulup zeminde çimentolaşma ile mukavemet artışı sağlanarak yapılan zemin iyileştirme yöntemidir. Gerçekleşen puzolanik reaksiyon nem ve ısı etkisi ile zamana bağlı geliştiği için zamanla mukavemet artışı devam etmektedir (Özaydın 1989).

Bitüm ile iyileştirme; bitüm malzemesi zemini suyun zararlarına karşı konulmasında ve zemin tanelerini bağlayıcı yönde etki etmektedir. Bitüm ince taneli zeminlerde tanelerin

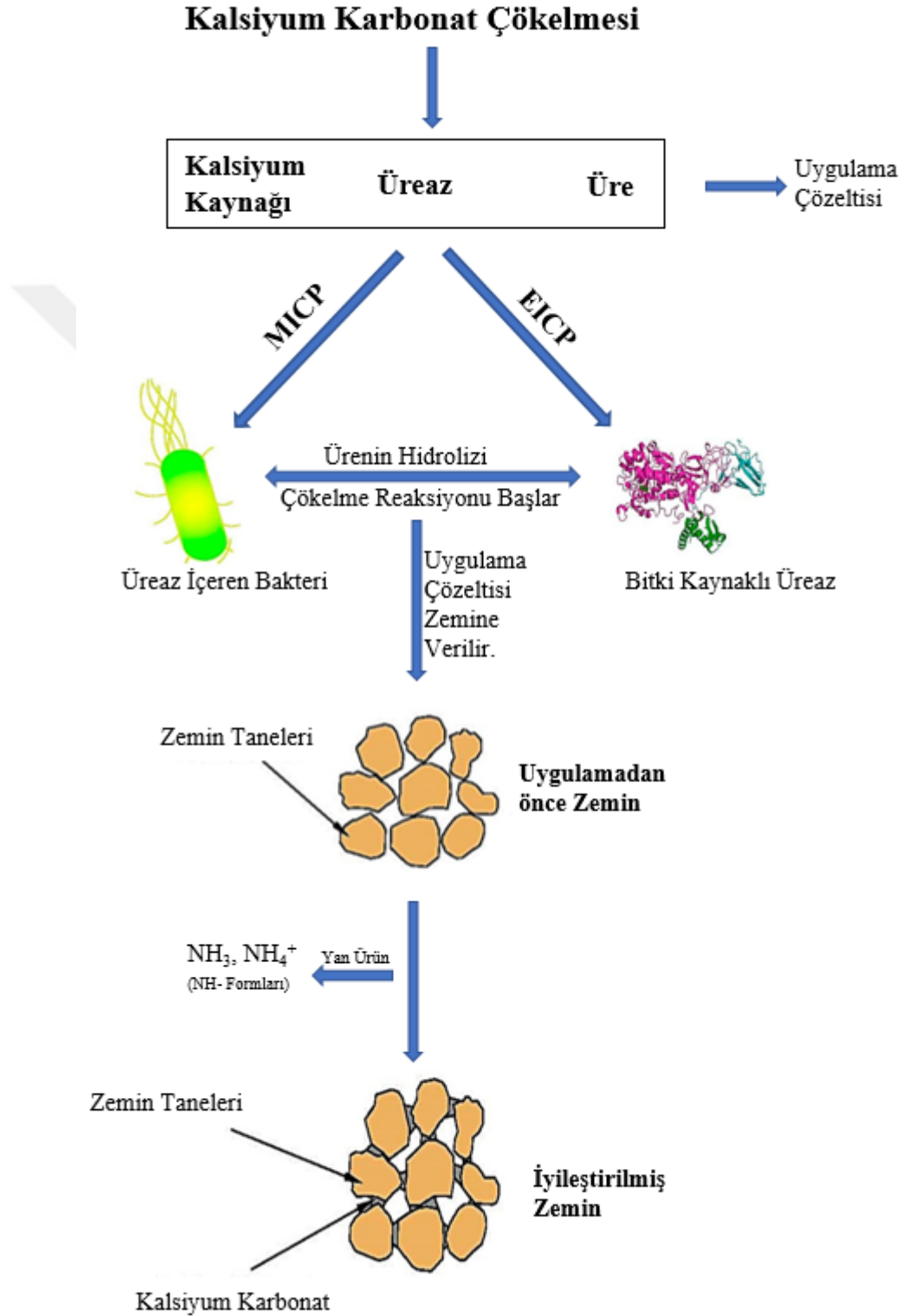
yüzeylerini sararak sudan dolayı kıvamının değişmesini engelleyici bir etki oluştururken kohezyonsuz zeminlerde kohezyon oluşmasına neden olmaktadır (Demiröz ve Karaduman, 2009).

Geleneksel zemin iyileştirme yöntemlerinin çevresel ve ekonomik açıdan hala bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Yüksek viskoziteleri ve hızlı sertleşme süreleri nedeniyle kimyasal katkıları enjekte etmek için genellikle yüksek basınçlar gerekmektedir. Bunun yanında bu yöntemlerin çoğu pahalıdır, ağır makineler gerektirir, kentsel altyapıyı bozar ve önemli çevresel etkiye sahip kimyasallar içerir. Bu zorluklara yönelik ortak bir çözüm, kazık yöntemlerini kullanmaktır. Öte yandan, kazık kullanarak zemin iyileştirme, ağır makineler ve daha uzun süreler gerektiren ekonomik olmayan bir çözümdür (Kirsch and Bell 2013). Geleneksel yöntemlerin bu zorlukları ve sınırlamalarından üstesinden gelebilmek için inşaat mühendisleri en az dezavantaja sahip yeni zemin stabilizasyon yöntemleri aramaya veya geliştirmeye çalışmaktadır. Daha yakın zamanlarda, kalsit çökmesi ile zeminlerin iyileştirilmesini amaçlayan biyo- aracı (biyo-stabilizasyon) zemin iyileştirme tekniği, 15 yıldan daha fazla bir süredir araştırılmaktadır. Bu yöntem, minimum maliyet ve daha düşük çevresel etkilerle çok işlevli çözümler sunmaktadır (van Paassen 2009; DeJong *et al.* 2011; Hoang 2018).

Kalsit (CaCO_3) Çökmesi İle Zeminlerin İyileştirilmesi

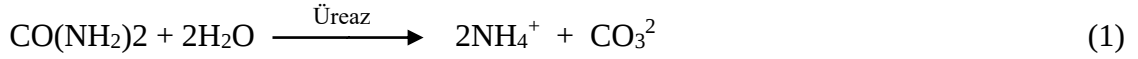
Birçok araştırmacı, granüller zeminler için bir bağlayıcı olarak kalsiyum karbonatın çökme potansiyelini araştırmaktadır. Kalsiyum karbonatın (CaCO_3) çökmesi, fotosentez, sülfat indirgenmesi, denitrifikasyon, amonifikasyon gibi farklı mekanizmalar yoluyla gerçekleşebilir (Yıldırım *et al.* 2016). Ancak, tüm bu mekanizmalar arasında, en kapsamlı olarak araştırılan teknik, üre hidrolizi yoluyla karbonat çökmesidir. Bu teknik, sulu bir çözeltide üre hidrolizini katalize etmek için enzim üreazına dayanır ve kalsiyum (Ca^{+2}) iyonlarının varlığında kalsiyum karbonat (CaCO_3) çökmesine yol açan karbonat iyonları ve alkalinite oluşturur. Ürenin hidrolizi, doğada çok yavaş bir hızda kendiliğinden meydana gelebilir, ancak üreaz enzimi bir katalizör olarak kullanıldığında reaksiyon kinetiği 10^{14} kat hızlandırılır (Kayastha and Das 1999). Üre hidrolizi yoluyla kalsit çökmesi, mikrobiyal aracı kalsit çökmesi (MICP) ve enzim aracı kalsit çökmesi (EICP) olarak adlandırılan iki farklı yöntem ile gerçekleştirilmektedir. Bu iki yöntemi birbirinden ayıran üreaz kaynağıdır. MICP zemin iyileştirme yönteminde üre hidrolizi için üreaz kaynağı olarak ürolitik bakteriler (üreaz içeren bakteriler) kullanılırken EICP zemin iyileştirme yönteminde ise bitkilerden üretilmiş serbest üreaz enzimi kullanılmaktadır.

MICP ve EICP benzer adımları takip ederek bazı biyolojik-kimyasal süreçler sonucunda zeminde kalsit (CaCO_3) oluşumuna neden olur. Oluşan kalsit zeminin boşluklarını doldurur ve zemin tanelerini birbirine bağlayarak zeminin mukavemet, geçirgenlik, oturma gibi özelliklerini iyileştirir. Bu iki yöntemin zeminde kalsit oluşturma süreci şematik olarak Şekil 1’de gösterilmiştir.

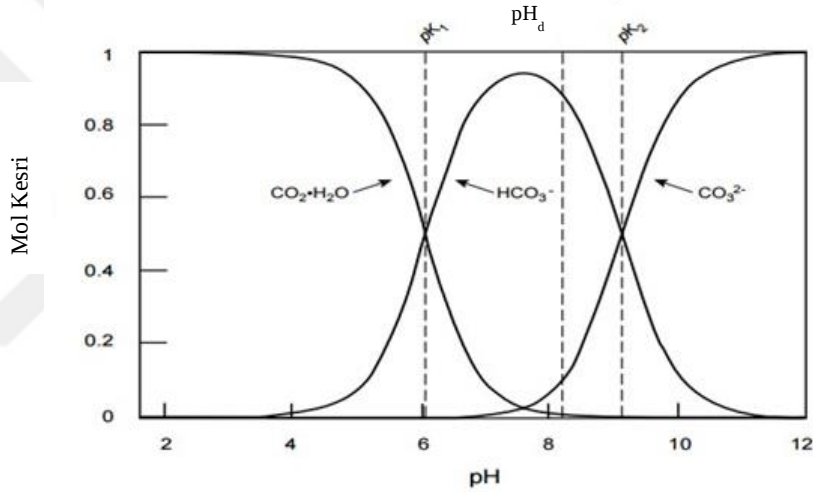


Şekil 1. Kalsiyum karbonat çökmesinin şematik gösterimi (Saif *et al.* 2022)

Daha önce belirtildiği gibi kalsit çökmesi, üre hidrolizi reaksiyonu olarak bilinen bir dizi kimyasal prosesler sonucunda gerçekleşmektedir. Üreaz (MICP’de üreaz içeren bakteri, EICP’de bitki bazlı üreaz), üre ile biyokimyasal reaksiyona girerek üreyi amonyum (NH_4) ve karbonata (CO_3^{2-}) hidrolize etmektedir. Bu süreçteki kimyasal reaksiyon Eşitlik 1’de verilmiştir. Üre hidrolizi kimyasal reaksiyonunda üreaz bir katalizör görevi görür ve reaksiyonun kinetiğini önemli ölçüde hızlandırır (Eşitlik 1).



İlk reaksiyon çözeltinin pH’sını artırır. pH’taki bu artış karbonat çökmesi için ideal bir koşul yaratarak karbonat oluşmasına neden olur. Jacob (1999), deniz suyuunda CO_3 ’ün türleşmesinin, Şekil 2’de gösterildiği gibi pH’a bağlı olduğunu bildirmiştir. pH yüksek olduğunda, karbonat (CO_3^{2-}) oluşma olasılığı daha yüksektir.



pH_d ; Deniz suyu pH değeri

Şekil 2. Karbonat (CO_3)’ün deniz suyuunda pH’a karşı türleşmesi (Jacob 1999)

Kalsiyum (Ca^{2+}) iyonları (sıklıkla kalsiyum klorür, CaCl_2), Eşitlik 2’de verilen kimyasal reaksiyonda olduğu gibi karbonat iyonları (CO_3^{2-}) ile birleşerek zemin matrisi boyunca kalsiyum karbonat (CaCO_3 , kalsit) oluşturmaktadır (Van Paassen 2009).



Eşitlik 2’deki reaksiyonunda kullanılan kalsiyum iyonlarının kaynağı CaCl_2 ise, bu reaksiyon aynı zamanda istenmeyen bir yan ürünü olan amonyum klorür üretimine yol açar (Almajed 2017);

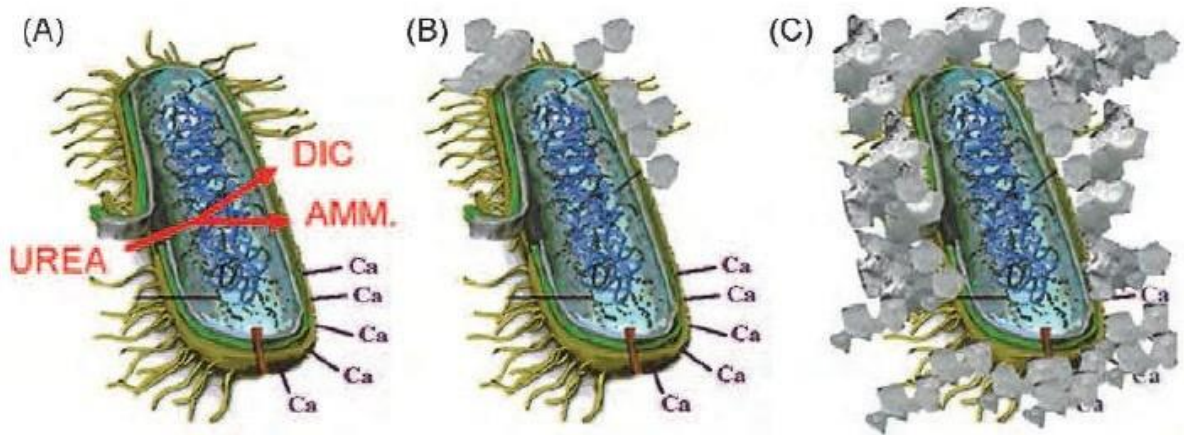


Amonyum klorür, yer altı suyunda bir kirletici olarak kabul edilir ve zeminin işlenmesinden sonra çıkarılması gerekir. Ortamdaki amonyum klorür varlığı sudaki yaşam formları için toksiktir.

Kalsiyum karbonat (CaCO_3) kalsit, aragonit ve vaterit olmak üzere farklı karakteristik özelliklere sahip üç susuz kristalin polimorfa sahiptir. Kalsit, CaCO_3 'ün termodinamik açıdan en kararlı polimorfudur ve kalsiyum karbonat kayaçlarında ve zemin yüzeyinde çimentolama maddelerinde birincil üründür. Aragonit ve vaterit, EICP veya MICP sırasında oluşabilen termodinamik olarak kararsız polimorflardır ve kolaylıkla kalsit haline dönüşebilir (Hariharan *et al.* 2014; Hamdan 2015).

Mikrobiyal Aracılı Kalsit Çökmesi (MICP) İle Zeminlerin İyileştirilmesi

Mikrobiyal aracılı kalsit çökmesi (MICP) bir diğer adıyla biyolojik zemin iyileştirme tekniği, zemin iyileştirme tekniklerine yeni bir yaklaşım olarak ortaya çıkmış ve 2004'ten beri geoteknik mühendisliğinin gelişmekte olan bir dalı olmuştur (Chu *et al.* 2011). MICP, kalsiyum karbonatın çökmesine katalize etmek için üre hidrolizi reaksiyonunda üreaz enzim kaynağı olarak ürolitik bakterilerin aktivitesini kullanır. Ürolitik bakterilerde bulunan üreaz, ürenin amonyak ve karbondioksit parçalanmasını katalize ederek kalsiyum iyonları ile birleştirilmesinden sonra CaCO_3 'ün çökmesine neden olurlar (Eşitlik 1 ve 2). Bakterilerde oluşan üre üreaz aktivitesi tarafından başlatılan kalsiyum karbonat çökeltisi mekanizması Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. Bakterilerde oluşan üre enzim aktivitesi tarafından başlatılan kalsiyum karbonat çökeltisi mekanizması (Gupta *et al.* 2013) *(A) Ca iyonlarının bakteriye tutunması. (B) Bütün hücrenin kapsüllenmesi. (C) Kalsiyum karbonat çökmesinin sonlanması

Sporsarcina Pasteurii DSM33 (DSMZ, FRG), zemin iyileştirmesi için MICP tekniğinde kullanılan en popüler ürolitik bakterilerdir. *S. pasteurii*, nispeten yüksek aktiviteye ve yüksek üreaz enzimi üretimine sahip aerobik, alkalofilik, gram pozitif bir bakteridir. *S.*

Pasteurii patojenik veya genetiği değiştirilmiş değildir, zemine zarar verebilecek değiştirilebilir elementleri içermez ve üre hidrolizinin bir yan ürünü olan amonyum tarafından baskılanmaz (Kaltwasser *et al.* 1972; Henze *et al.* 2018).

Genel olarak, MICP'de kullanılan ürolitik bakteriler kontrollü koşullar altında büyütülür ve daha sonra bir üre ve kalsiyum klorür çözeltisi ile zemine uygulanır. Bununla birlikte, son çalışmalar, ürolitik bakterilerin yerinde uyarılmasını ve ardından bir üre ve kalsiyum klorür çözeltisinin kullanılmasını araştırmıştır (Burbank *et al.* 2012; Gomez *et al.* 2015).

van Paassen 2009, kum zeminin mekanik özelliklerini iyileştirmek için MICP sürecini dört aşama halinde gerçekleştirmiştir;

- 1) Uygun bakterilerin yetiştirilmesi,
- 2) Bakterilerin gözenekli ortama (zemin) yerleştirilmesi ve taşınması
- 3) CaCO_3 kristallerinin çökeltilmesi için biyo-kimyasal süreç oluşturmak üzere uygun substratların (üre, CaCl_2) zemine enjekte edilmesi, taneler arasındaki boşlukları doldurulması;
- 4) Kalan ürünlerin (NH_4Cl_2 gibi istenmeyen ürünler) çıkarılması.

Bakterileri kullanılarak CaCO_3 (Kalsit) çökmesi, kum taneleri arasında bağlayıcı bağlar oluşturarak tanelerin hareket kabiliyetlerini sınırlar ve kumun mukavemet ve rijitliğini artırır. Bununla birlikte bakterileri kullanılarak CaCO_3 çökmesi ile zeminin taneleri arasındaki boşluklar doldurulabilir, zemin porozitesi ve sıvılaşmaya yol açan hacim azalması eğilimi azaltılabilir ve kesme sırasında hacim genişlemesi (dilatasyon) eğilimi artırılabilir (DeJong *et al.* 2010; DeJong *et al.* 2014).

MICP'nin potansiyel geoteknik ve jeo-çevresel uygulamaları, zeminin sıvılaşma potansiyelini azaltmak, temellerin taşıma kapasitesini arttırmak, yer altı inşaatlarında yeraltı suyunun sızıntılarını engellemek, nehir kenarlarında veya kıyı bentlerinde sızıntıyı veya erozyonu kontrol etmek, kumlu zeminde rezervuarlar ve göletler inşa etmek, boru tesisatı yapmaktır. Ayrıca toprak baraj için, zemin şevin stabilitesini arttırmak, oturmayı veya zemin deformasyonunu kontrol etmek, zemin genişleme potansiyelini azaltmak, tünellerde damlamaları kapatmak, kayalarda çatlakları sabitlemek, çöllerde kum tanelerini sabitlemek, kirletici maddelerin tehlikesini önlemek için zemin yüzeyini geçirimsiz hale getirmek, ağır metallerin kirli ortamdan uzaklaştırılması vb. uygulamalarda kullanılmaktadır (Dilrukshi and Kawasaki 2016).

MICP kohezyonsuz zeminlere uygulanırken, sadece sınırlı sayıda çalışma ince taneli ve organik zeminlere odaklanmıştır. Bu araştırmalar, zeminlerin MICP ile işlenmesinin hem küçük

laboratuvar ölçeğinde hem de büyük ölçekte nispeten büyük mukavemet kazanımları ve belirgin bir geçirimsizlik düşüşü sağladığını göstermiştir. Akoğuz *et al.* (2019) yapmış oldukları çalışmada, MICP ile iyileştirilmiş kum zeminlerde en yüksek serbest basınç dayanım değerini 2435 kPa olarak bildirirken, geçirimsizlik değerlerinde ise % 23 ile % 90 arasında düşüşler bildirmiştir.

MICP, yemyeşil, sürdürülebilir ve doğa dostu bir zemin iyileştirme tekniği olarak bilinmesi ve zeminleri iyileştirmek için yaygın olarak kullanılmasına rağmen ince taneli zeminlere uygulanabilirliği ve uygulama maliyeti açısından bazı sınırlamalar ve dezavantajlara sahiptir. MICP'nin en önemli sınırlaması, biyolojik zemin iyileştirme sırasında biyo-tıkanmanın (zemin gözeneklerin tıkanması) meydana gelmesidir. Biyo-tıkanma, enjeksiyon noktalarının etrafında uygulama çözeltisinin hızlı çökmesinden oluşur; bu da reaktiflerin (üre- CaCl_2) homojen olarak dağılımını engellemekle kalmaz, aynı zamanda kalsitin sadece enjeksiyon noktaların etrafında oluşmasına neden olur (Hamdan *et al.* 2013; Saif *et al.* 2022).

Eksojen bakteri kolonilerinin genellikle zemine enjekte edilmeden önce belirli çevresel koşullar altında kültür ortamının içinde yetiştirilmesi gerektiğinden MICP stabilizasyonu maliyetli ve zaman alıcı olabilir. Ayrıca bakterilerin zemine enjeksiyonu zeminde bulunan mikroorganizmalara müdahale edebilir ve zeminin ekolojik dengesini değiştirebilir, böylece çevredeki ekosistem üzerinde uzun vadeli olumsuz bir etki yaratabilir (Akiyama and Kawasaki 2013; Gat and Tsesarsky 2016). Buna ek olarak, ürolitik bakterilerin zemine enjekte edilmesi, hükümetten onay ve lisanslar alınması ve güvenlik için mikrobiyal ekolojinin sürekli izlenmesi gibi birçok sorunu içerir (Dilrukshi and Kawasaki 2016).

Son olarak MICP zemin iyileştirme tekniğinin diğer önemli sınırlamalarından biri, iyileştirilecek zemin matrisinin gözenek boyutudur. Ürolitik bakterilerin boyutu tipik olarak 0,5 – 3 μm aralığındadır ve 0,3 μm 'den daha küçük gözeneklerin içine sığamayacak kadar büyüktür, bu da MICP'nin ince taneli ve oldukça sıkı kohezyonsuz zeminlere uygulanmasını engeller. Silt zeminlerin boyutu tipik olarak 2-63 μm arasında değişirken kil parçacıkları 2 μm 'den küçüktür (Sessitsch *et al.* 2001). Siltli veya killi taneler, bakterilerin zemin matrisi içinde taşınmasını kısıtlayan çok daha dar gözeneklere sahip olduğundan MICP'nin etkinliğini sınırlar (Mitchell ve Santamarina 2005). Ayrıca daha ince zemin partikülleri, zeminin daha az geçirimli olmasına neden olur ve bu da bakterilerin yetiştirilmesi için sağlanan besinlerin akışını sınırlar. Belirtilen sınırlamalarından dolayı kalsiyum karbonatın çökmesi için bakteri yerine bitki kaynaklı serbest üreaz enzimi kullanan EICP, MICP tekniğine alternatif bir teknik olarak geliştirilmiştir.

Enzim Aracılı Kalsit Çökmesi (EICP) Yoluyla Zeminlerin İyileştirilmesi

Bu çalışmada kullandığımız Enzim aracılı kalsit çökmesi (EICP), MICP (mikrobiyal aracılı kalsit çökmesi) yönteminin bazı sınırlamalarına bir çözüm olarak etkili bir zemin iyileştirme tekniği olarak geliştirilmiştir. EICP tekniğinde zeminin matrisi boyunca kalsit oluşumunu sağlamak için MICP'den farklı ürolitik bakteriler yerine bitkilerden üretilen serbest üreaz enzim kullanılmaktadır.

Kalsiyum karbonatın çökmesi için bitki kaynaklı üreaz enzimin kullanımı bakterilere göre bazı avantajlar sunmaktadır. EICP'de, üreaz, üre ve kalsiyum iyonlarının yanında bir reaktan olarak doğrudan zemine verilir. Üreazın zemine doğrudan dahil edilmesi, bakterilerin yetiştirilmesi ve sabitlenmesiyle ilişkili karmaşıklıkları, zemin derinliklerde oksijen eksikliğinin ve zemin içindeki yerli mikroorganizmaların müdahalesinin yarattığı zorlukları ortadan kaldırır (Saif *et al.* 2022).

Bitki kaynaklı üreaz yaklaşık 12 nm boyutundayken ürolitik bakterilerin (bakteri kaynaklı üreaz) boyutu 300 -5000 nm arasındadır. Örnek olarak, *S. pasteurii* hücrelerinin ortalama boyutu yaklaşık 2800 nm olup bitki kaynaklı üreaz boyutundan iki yüz kat daha büyüktür. Uygulaması kaba zeminlerle sınırlı olan MICP'nin aksine, EICP küçük gözeneklerin içine nüfuz edebilen üreaz enzimin küçük boyutu sayesinde daha ince taneli zeminlerin iyileştirilmesi için kullanılabilir. Bununla birlikte, üreaz enzimi CaCO_3 çökme sırasında biyofilmler veya ekstra polimerik maddeler üretme yeteneğine sahip değildir ve bu da, biyo-tıkanmayı büyük ölçüde azaltır ve silt gibi daha ince taneli zeminlere EICP uygulanabilirlik aralığını genişletir (Blakely *et al.* 1984; Dominique *et al.* 2014; Hamdan *et al.* 2013).

Serbest üreaz enzimin kullanmanın bir başka avantajı, üreaz aktivitesi açısından kısa veya sınırlı bir ömre sahip olmasıdır. Üreaz enzimin kısa ömürlü olmasından dolayı zamanla yok olacaktır ve böylece ekosisteme olumsuz etkileyecek uzun vadeli biyolojik etkilerden kaçınılacaktır. Serbest üreaz enziminin kısa bir sürede yok olmasına rağmen, zemin partiküllerine bağlı tüketilen üreaz aktivitesi herhangi bir işlev kaybı olmadan daha uzun süre devam edebilir. Son olarak üreazın kalsit çökmesi için kullanımı, kültür ortamında yetiştirilmesi veya uyarmaya gerek olmadığından, ürolitik bakterilerin kullanımından daha basittir.

EICP tekniğinin zeminlere uygulanması

Enzim aracılı kalsit çökmesi (EICP) zemin iyileştirme tekniğinde zeminleri iyileştirmek amacıyla zemine verilecek uygulama çözeltisi, üre ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), kalsiyum tozu (sıklıkla CaCl_2) ve üreaz içeren bir çözeltiden oluşmakta ve bu çözelti çalışmaların çoğunda,

EICP uygulama çözeltileri olarak adlandırılmaktadır. EICP uygulama çözeltileri zemine verildikten sonra, üreaz üreyi hidrolize ederek kalsitin çökmesini sağlar. Zemin boşluklarında oluşan kalsit zemin tanelerinin bağlanmasına ve kayma mukavemetinin artmasına, geçirimsizliğin azalmasına sebep olmaktadır. EICP'nin zemine uygulama ve kimyasal sürecinin şeması Şekil 4'te verilmiştir.

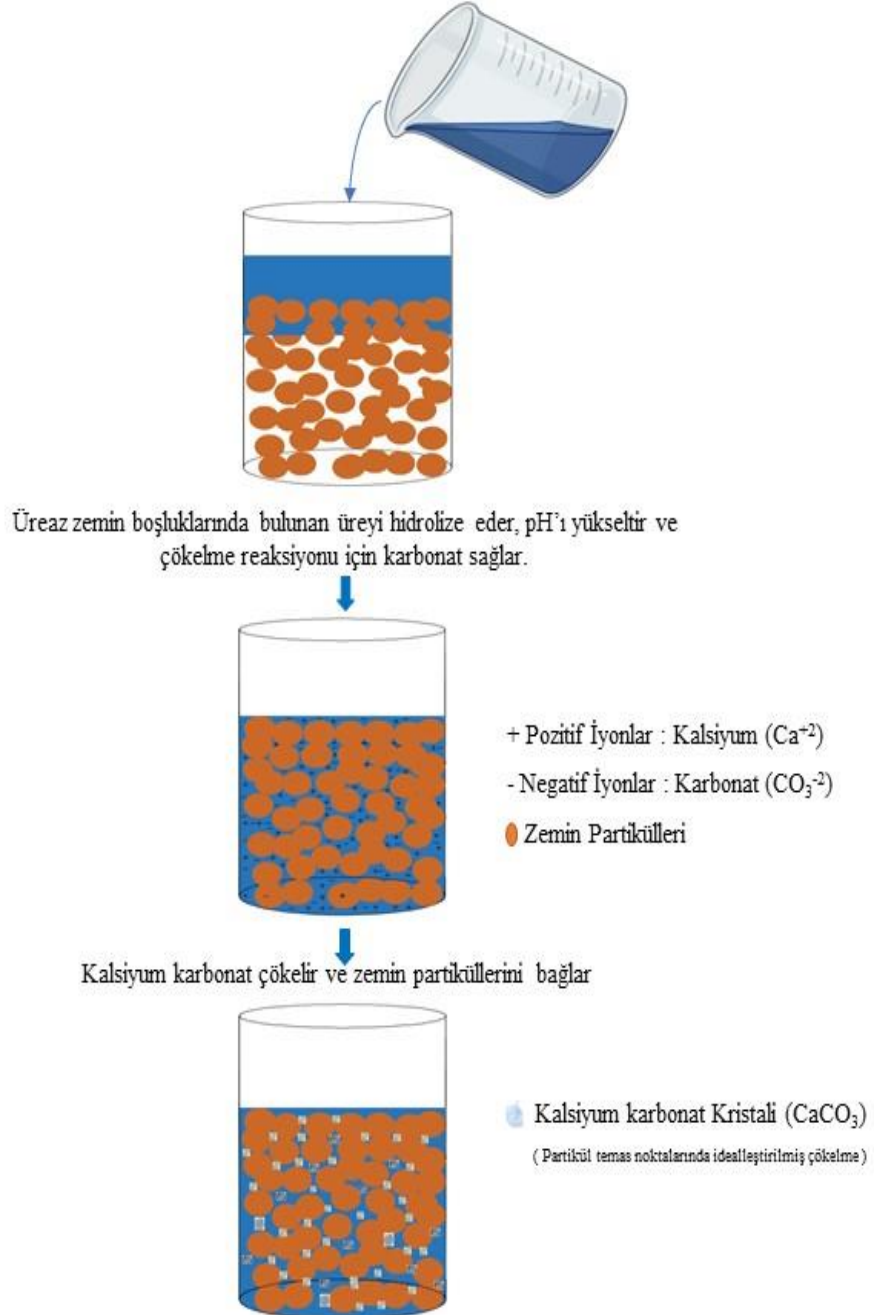
Literatürde EICP uygulama çözeltileri zemin numunelerine karıştırma- sıkıştırma ve süzülme olmak üzere iki farklı yöntemle verilmektedir.

Süzülme Yöntemi; Süzülme, EICP zemin iyileştirme çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde kuru zemin kalıba yerleştirilir ve EICP uygulama çözeltilerinin (genellikle üre, CaCl_2 ve üreaz enziminden oluşur) önceden belirlenen hacmi zemin numunelerin tepesinden süzülür. Bazı çalışmalarda, kuru zemin üreaz tozu ile önceden karıştırılmış, ardından üre- CaCl_2 çözeltisi zemin numunesinin tepesinden süzölmüş ve numuneler sertleşmeye bırakılmadan önce süzölen çözelti yerçekimi ile numunelerin altından boşaltılmıştır (Yasuhara *et al.* 2011; Hamdan 2015; Almajed *et al.* 2018a; Putra *et al.* 2017a).

Karıştırma ve Sıkıştırma Yöntemi; Bu yöntemde kuru zemin sulu bir EICP uygulama çözeltileri ile homojen bir şekilde karıştırılır. Daha sonra zemin birden fazla katman halinde numune kalıbına sıkıştırılır ve birkaç gün sertleşmeye bırakılır (Almajed 2017).

Son yıllarda EICP ile zeminlerin iyileştirilmesi konusunda yapılan çalışmalar artış göstermektedir. EICP tekniği kullanılarak zeminlerin fiziksel özellikleri (yoğunluk, gradasyon, porozite, doygunluk), mekanik özellikleri ve mühendislik özellikleri (sıkılık, sıkışabilirlik, kohezyon, çimentolama ve sürtünme açısı) iyileştirilebilir (Almajed *et al.* 2018; Putra *et al.* 2017b; Hamdan *et al.* 2014).

Enzim aracılı kalsit çökmesi (EICP) zemin iyileştirme tekniği buradakilerle sınırlı olmamakla birlikte geoteknik mühendisliğinde çok çeşitli potansiyel uygulamalara sahiptir. Bu geniş uygulamalar, kısmen EICP'de kullanılan serbest üreaz enziminin, MICP'de kullanılan ürolitik bakterilere kıyasla daha küçük boyutundan kaynaklanmaktadır. EICP'nin potansiyel uygulamaları arasında su ve rüzgardan kaynaklanan erozyonun önlenmesi, yeraltı bariyerlerinin oluşturulması, kazı stabilizasyonu, betondaki çatlakların giderilmesi, zemin çivilemesi, sıvılaşmanın azaltılması, sıkı temellerin taşıma kapasitesinin artırılması, şev stabilitesi ve temel desteği bulunmaktadır (Knorr 2014; Hamdan 2015; Bang *et al.* 2009; Almajed *et al.* 2018 a).



Şekil 4. EICP sürecinin zeminde şematik gösterimi

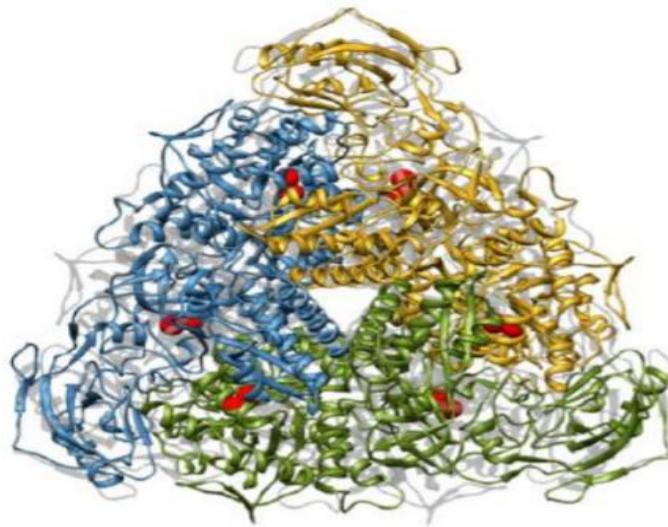
Enzim ve Üreaz Enzim

Enzimler; tüm canlıların yapısında bulunan, esas olarak proteinden oluşmakla beraber, organik-inorganik maddeleri de bünyesinde barındıran, biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştiren biyokatalizörlerdir. Katalizör; Termodinamik açıdan olası bir tepkimeyi, farklı bir mekanizma üzerinden gerçekleştirerek reaksiyon hızını arttıran ve reaksiyona girdiği gibi değişmeden çıkan maddelerdir.

Bilinen tüm enzimler reaksiyon özgüllükleri ve substrat özgüllükleri dikkate alınarak “Enzim Komisyonu (E.C.)” tarafından Oksidoredüktazlar, Transferazlar, Hidrolazlar, Liyazlar, İzomerazlar ve Ligazlar olmak üzere altı sınıfa ayrılmıştır (Keha ve Küfrevioğlu 2011).

Üreaz enzimi hidrolazlar sınıfından bir enzim olup, üreyi amonyak (NH_4^+) ve karbondioksite (CO_3^{2-}) hidroliz eden nikel bağlı bir enzimdir (Follmer *et al.* 2004). Kalsiyum karbonat çökmesini sağlamak üreazın doğadaki en önemli işlevlerinden biridir. Süreç; üre hidrolizinden üretilen karbonat iyonları ve reaksiyon sırasında artan pH miktarı sayesinde ortamda bulunan kalsiyum (Ca) iyonları varlığında kendiliğinden kalsiyum karbonat (CaCO_3) çökmesi meydana gelir. Bu süreç doğada kendiliğinden olabildiği gibi biyolojik ve kimyasal araçları kullanarak laboratuvar şartlarında yapay olarak da gerçekleştirilebilir (Akoğuz 2019).

Üreaz 1926 yılında James B Sumner tarafından Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) fasulyesi tohumundan kristal protein olarak izole edilmiştir. Üreaz, belirli çevresel ve kimyasal koşullar altında geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak değiştirilebilen kimyasal bağlanma ve elektrostatik etkileşimlere dayalı karmaşık üç boyutlu yapılara sahiptir (Hamdan 2015). Üreaz enziminin üç boyutlu yapısı Şekil 5’te gösterilmektedir.



Şekil 5. Jack Bean Fasulyesi’nin (*Canavalia ensiformis*) üreaz enziminin üç boyutlu yapısı (Maroney and Ciurli 2014)

Üreaz Enzim Kaynakları; Üreazlar, doğada yaygın olarak bulunan enzimlerdir. Bitkiler, mikroorganizmalar (bakteri, mantar, maya ve funguslar) ve omurgasızlar gibi birçok canlı grubu üreaz içermektedir. Ayrıca, üreaz enzim toprak, doğal su kaynakları ve hatta insanın vücudunun çeşitli dokularında yüksek oranda bulunmaktadır (Dilrukshi and Kawasaki 2016).

Bitkisel Üreazlar (Serbest Üreaz); Literatürde en iyi bilinen ve en çok araştırılan bitki üreazı, Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) fasulyesinden elde edilen üreazdır. Kavun, karpuz ve kabak tohumları, lahana yaprakları çam ailesi dahil olmak üzere birçok yaygın bitki ailesi, üreaz bakımından zengindir (Das *et al.* 2002). Üreaz, belirtilen bitkilerin yapraklarında da bulunur. Ayrıca soya fasulyesi (*Glisin Max*) tohumu ve yaprağı, kılıç fasulyesi (*Canavalia gladiata*), güvercin bezelyesi (*Cajanus cajan*), soya küspesi, dut yaprağı (*Morus alba*) ve benzeri gibi bitkiler üreaz içerir (Sirko and Brodzik 2000; Dilrukshi and Kawaski 2016; Takatsu *et al.* 2016).

Bitki kaynaklı üreaz enzim, zemin iyileştirme uygulamalarda genellikle saflaştırılmış bir şekilde ticari olarak temin edilir. Ancak üreaz enzimin tıp, gıda ve biyomedikal laboratuvarlarında kullanılmak üzere üretilir ve bunun için zemin iyileştirme uygulamalarında kullanılması durumunda EICP uygulamasının toplam maliyetinin %57-%98'ini oluşturur ve büyük ölçekle zemin iyileştirme uygulamalarda ekonomik açıdan uygun olmayabilir (Almajed *et al.* 2021). Son zemin iyileştirme çalışmalarında, üreaz enzimin maliyetini düşürmek amacıyla üreaz enzimi, yerel marketlerde bulunan ve üreaz aktivitesi yüksek olan bitki tohumları ve fasulye çeşitlerinden laboratuvar ortamında izole edilmiştir. Dilrukshi *et al.* (2018) ve Baiq *et al.* (2020) yapmış oldukları çalışmalarında bitkiler ve tohumlardan üreaz enziminin ekstraksiyonu, temel laboratuvar ekipmanları ile kolay bir şekilde gerçekleştirilebileceğini göstermişlerdir. EICP'de üreaz enzimi laboratuvarında elde edilerek yapılan çalışmaların bazıları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. EICP İle Yapılan Bazı Çalışmalarda Kullanılan Bitki Üreaz Enzim Kaynakları

Üreaz Kaynağı	Laboratuvar Enzim	Ticari Enzim	Zemin Tipi	Araştırmanın amacı	Referans
Jack Fasulyesi	x	x		Ticari ve laboratuvar üreaz enzimlerin karşılaştırılması	Nam <i>et al.</i> 2015
Karpuz tohumları	x		Silis Kumu (D 50:0,72)	Ürolitik verimliliğin araştırılması	Javadi <i>et al.</i> 2018
Soya fasulyesi	x		Siltli kil zemin	Zeminin su erozyonuna karşı güçlendirilmesi	Cuccurullo <i>et al.</i> 2019
Karpuz tohumları	x		Kum (D50: 0,88)	Zemin mukavemetinin artırılması	Dilrukshi <i>et al.</i> 2018
Lahana ve Soya küspesi	x		-	Üreaz içeren bitki kaynakların araştırılması	Baiq <i>et al.</i> 2020
Sarı soya fasulyesi	x		Kili kum (SC)	Zemin mukavemetinin artırılması	Lee ve Kim 2020
Jack Fasulyesi		x	Kum (D50 : 0,72)	Zemin mukavemetinin artırılması	Almajed <i>et al.</i> 2018a

Mikrobiyal Üreazlar; Mikrobiyal üreazlar, ürolitik mikroorganizmalar (bakteri, mantar, maya, funguslar ve alg) tarafından üretilen bir üreaz enzimdir. Karbonat çökmesine neden olabilecek beş ana mikroorganizma grubu vardır. Bunlar Siyanobakteri ve Alg (*Anabaena cylindrica*, *Bacillus pasteurii* vb.), Ürolitik bakteriler (*Bacillus sphaericus*, *Bacillus megaterium* vb.), nitrat indirgeyen bakteriler (*Nitrosomonas* türleri), Mikrobakteriler (*Myxococcus xanthus*) ve sülfat indirgeyen bakteriler (*Desulfobacterium autotrophicum*) olarak sıralanabilir (Yıldırım *et al.* 2016). Mikrobiyal aracılı kalsit Çökmesi (MICP) zemin iyileştirme metodu üzerinde yapılan çalışmalarda, çoğunlukla üreaz aktivitesi yüksek olan *Sporosarcina pasteurii* adlı ürolitik bakterisi kullanılmaktadır.

Üreaz Enzimin Aktivitesi ve Ölçümü

Bir enzimatik tepkimenin hızı, üreaz enzimin etkinliği veya üreaz enzimin aktivitesi ile ilişkilidir. Bir üreazın aktivitesi, o üreaz tarafından katalizlenen enzimatik tepkimenin hızının, üreaz etkisiyle optimum koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir. Etkinliği veya aktivitesi fazla olan bir üreaz, belirli bir sürede daha fazla substrat molekülünü ürün haline dönüştürür.

Enzim aktivitesi, enzimin belli koşullarda sahip olduğu aktif enzim miktarının bir ölçüsüdür ve bir çözelti içindeki enzim aktivitesi “enzim ünitesi” cinsinden verilir. 25°C’de ve optimal koşullarda 1 µmol (10⁻⁶ mol) substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarına

“enzim ünitesi” denir ve EU veya U şeklinde gösterilir. Bir enzim ünitesi (U): 1 $\mu\text{mol/dak}$ ’dır (Keha ve Küfrevioğlu 2011).

Üreaz aktivitesini belirlemek için pH değişimi, İletkenlik, İndofenol, Nesslerizasyon, Spektrofotometrik ve Nesslerizasyon yöntemi gibi çeşitli yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajları Tablo 2’de gösterilmektedir (Javadi 2021).

Tablo 2. Üreaz Aktivitesi Tayin Yöntemleri (Javadi 2021)

Yöntemler	Avantajlar	Dezavantajları
Kolorimetrik Yöntem (İndofenol Yöntem)	1. Basit ve nicel spektrofotometrik bir deneydir. 2. Hassas bir yöntemdir ($<0.02 \mu\text{mol amonyağı}$ kolayca tespit edebilir). 3. Ayrıntılı kinetik analizlerde faydalı	1. Her testten birden fazla numune alınmasını gerektirir 2. Birkaç üreaz inhibitörünün bu yönteme müdahale ettiği bulunmuştur.
Kolorimetrik Yöntem (Nesslerizasyon)	Kolay ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilir.	1. Düşük hassasiyet 2. Deney sırasında zararlı kimyasallar üretir
Spektrofotometrik Test (Çifte Enzim)	Hassas bir yöntem, mL başına 0.003 U üreazı kolayca tespit edebilir.	1. Glutamat dehidrojenaz, çoğu üreazdan daha yüksek bir pH optimumuna (pH 8.3) sahiptir. 2. Çifte enzimi, üreaz inhibitörleri olarak test edilen bileşikler tarafından inhibe edilebilir.
pH değişim yöntemi	Üreaz oranlarının rutin olarak karşılaştırılması için uygun bir deneydir. Kullanımı basittir.	1. Test çözeltisinin pH’sı, enzim aktivitesini etkileyen analiz sırasında artacaktır. 2. Ayrıntılı kinetik analiz için önerilmez
Potansiyometrik	Kısa sürede gerçekleşir ve doğruluk hassasiyeti yüksek bir yöntemdir.	1. Düşük hassasiyet 2. Potasyum ve diğer tek değerli iyonlar tarafından girişim.
İletkenlik	1. Kullanımı basittir. 2. Kolay ve hızlı bir şekilde gerçekleşir.	1. Zararlı kimyasallar kullanılamaz. 2. Açık sistemde doğru değil

Belirtilen yöntemlerde çözeltideki üreaz, ürenin hidrolizi reaksiyonu sonucunda oluşan amonyak gibi yan ürünleri, pH veya iletkenlikte artışları ve ayrıca üretilen ısı ölçülerek incelenmektedir. pH değişim yöntemi, yapılışı basit olmalarına rağmen bazen iyi sonuçlar

vermezler, oda sıcaklığı koşulları ve operatörün becerilerine büyük ölçüde bağlıdır. Son zamanlarda, bazı geoteknik araştırmacılar üre hidroliz reaksiyonu sırasında amonyak salınımını gösteren iletkenlik yöntemini kullanmışlardır. İletkenlik artışı hızı, çözeltide bulunan aktif üreaz miktarı ile orantılıdır. İletkenlik yöntemi basittir, zamandan tasarruf sağlar ve pahalı ve zararlı kimyasallar kullanmaz (Dilrukshi and Kawasaki 2016).

Nessler (Nesslerizasyon), İndofenol, Spektrofotometrik ve Potansiyometrik yöntemlerinde çözeltideki üreazı, üre hidrolizi reaksiyon sonucunda salınan amonyak (NH_3) yan ürünlerini ölçererek değerlendirilmektedir. Bu çalışmada, üreaz aktivitesi ölçümü için yapılışı kolay ve kısa sürede gerçekleştirilebileceğinden dolayı Nessler yöntemi kullanılmıştır.

Taguchi Yöntemi

Ürün ve sürecin en uygun parametre seviyesini seçerek çıktı değerlerindeki değişimi en aza indirmeyi amaçlayan Taguchi Metodu (TM), kalitenin sürekliliğini sağlamak ve parametrelerini iyileştirmek için Genichi Taguchi tarafından geliştirilen bir metottur. Bu metot, değişkenliği oluşturan kontrol edilemez faktörlere karşı ürün ve süreç için kontrol edilebilir faktör seviyelerini optimize eder ve böylece ürün ve süreçteki değişkenliği en aza indirmeye yardımcı olur (Öktem 2012). Taguchi metodunun esas amacı, hedeflenen kaliteye göre yapılacak deney sayısının büyük oranda azaltılmasıdır. Böylece hedeflenen kalitede ürün daha az deneme sayısı ile elde edilmiş olacaktır. Ayrıca deney sayısı azaltılarak ürün maliyeti en aza düşürülmüş olacaktır. Taguchi metodunda, amaçlanan değerler, sonucu etkileyecek kontrol edilebilen parametreleri ve seviyeleri içeren ortogonal diziler sayısında saptanmaktadır.

Taguchi deneyi tasarımı belirlenen parametre ve seviyelere göre ortogonal dizinler oluşturularak uygulanmaktadır. Bu çalışmada kullanılan 5 parametre (faktör) ve 3 seviyeli L25 ortogonal dizisi Tablo 3'te verilmiştir. Tablodaki F1, F2 ve F3 çalışmada seçilen parametreleri gösterirken, her deney numarası satırındaki rakamlar ise parametrelerin seviyelerini göstermektedir. Bu tablo ile $5^3 = 125$ deneme sayısı yerine 25 adet deneyi yapılarak elde edilen sonuçlar üzerinde değerlendirme yapılabilmektedir.

Tablo 3. L25 Ortogonal Dizin

Parametreler ve Seviyeleri			
Deney No	F1	F2	F3
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	1	4	4
5	1	5	5
6	2	1	2
7	2	2	3
8	2	3	4
9	2	4	5
10	2	5	1
11	3	1	3
12	3	2	4
13	3	3	5
14	3	4	1
15	3	5	2
16	4	1	4
17	4	2	5
18	4	3	1
19	4	4	2
20	4	5	3
21	5	1	5
22	5	2	1
23	5	3	2
24	5	4	3
25	5	5	4

Taguchi yöntemi yüksek kalite sistemlerinin tasarımı için kullanılan iyi bir araç olup ve performans ve kalite tasarımlarının optimizasyonu için sistematik bir yaklaşım sağlar. Taguchi deneysel metodu kullanılarak yapılacak optimizasyonlar 8 adımda gerçekleştirilir.

1. Değerlendirilecek parametrelerin belirlenmesi
2. Bu parametrelere ait seviyelerin belirlenmesi
3. Uygun ortogonal dizisinin belirlenmesi

4. Ortogonal diziye dayanarak deney sonuçlarının metoda uyarlanması
5. Performans istatistiklerinin hesaplanması
6. Performans karakteristikleri kullanılarak sonuçların varyans analizi ile değerlendirilmesi
7. Optimum seviyelerin seçilmesi
8. Sonuçların doğrulanması (Tunçel 2018).

Taguchi, deneyi tasarımında verileri analiz etmek ve optimum koşulları elde etmek amacıyla, analiz değişkeni ya da performans kriteri olarak kullanılmak üzere, “sinyal/gürültü (S/N) oranı” adı verilen bir dizi kriter ortaya koymuştur. S/N oranının kullanılmasının asıl amacı, elde edilen sonuçlarda parametre değerlerinin optimum değere yaklaşp yaklaşmadığını değerlendirmektir. Taguchi, uygulamadaki problemleri, hedefin türüne göre nominal-en iyi yanıt, en küçük-en iyi yanıt ve en büyük-en iyi yanıt ve olmak üzere üç farklı performans karakteristiği (kriteri) belirlemiş ve her biri için farklı bir S/N oranı tanımlamıştır (Şirvancı 1997).

“En nominal-en iyi yanıt” performans karakteristiğini belirlemenin amacı; bir hedef değere ulaşmaktır (örneğin, hedeflenen bir kimyasal veya karışım oranına ulaşmak), Bu durumda, S/N oranı Eşitlik 4 kullanılarak hesaplanır;

$$S/N_N = -10 \log(Y^2/S^2) \quad (4)$$

“En küçük-en iyi yanıt” performans karakteristiğini belirlemenin amacı; yanıtı en az düzeye indirmektir (örneğin, yakıt tüketimini en aza indirmek). Bu durumda, S/N oranı Eşitlik 5 kullanılarak hesaplanır;

$$S/N = -10 \log\left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n yi^2\right) \quad (5)$$

Bu çalışmada kullandığımız “En büyük-en iyi yanıt” performans karakteristiğini belirlemenin amacı; yanıtı en üst düzeye çıkarmaktır (örneğin, ürün verimliliğini en üst düzeye çıkarmak). Bu durumda, S/N_L oranı Eşitlik 6 kullanılarak hesaplanır;

$$S/N_L = -10 \log\left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{yi^2}\right) \quad (6)$$

Yukarıda S/N oranları için belirtilen denklemlerde;

n : Deneyin tekrar sayısı

yi : Performans karakteristiği değeri

S^2 : varyansı ifade etmektedir.

S/N_L'yi maksimum yapan parametre seviyeleri optimumdur. Ancak Taguchi Metoduna göre optimum parametre seviyelerini veren deney yapılmamış olabilir. Dolayısıyla, optimum parametrelere göre bir doğrulama deneyi yapılmalıdır. Optimum koşullara karşılık gelen performans değeri Eşitlik 7 kullanılarak tahmin edilebilir.

$$Y_t = \mu + X_i + e_i \quad (7)$$

Burada;

μ : Performans değerinin genel ortalaması,

X_i : Deneydeki parametre-seviye kombinasyonun sabit etkisidir.

e_i : i. deneydeki rastsal hata

Doğrulama deneylerinin sonuçlarının anlamlı olup olmadığını belirlemek için deneysel veriler kullanılarak hesaplanan bir nokta tahmini ise, güven aralığının değerlendirilmesi gerekir. Seçilen bir hata seviyesindeki güven aralığı Eşitlik 8 ile hesaplanabilir (Hınıslioğlu ve Bayrak 2004).

$$CI = \mu \pm \sqrt{\frac{F(1,n_2)V_e}{N_e}} \quad (8)$$

Burada;

$F(1,n_2)$: Herhangi bir istatistik kitabından F tablosundaki F değeri,

V_e : Hatanın varyans değeri

N_e : Ortalamanın tahminindeki etkin tekrar sayısıdır ve Eşitlik 9 ile hesaplanır.

$$N_e = \frac{\text{Toplam sonuç sayısı (veya S/N oranlarının sayısı)}}{1 + \text{Faktörlerin toplam serbestlik derecesi}} \quad (9)$$

Literatür Özetleri

Yasuhara *et al.* (2012), yapmış oldukları çalışmada ticari üreaz kullanarak enzim aracılı kalsit çökmesi ile kum zeminin iyileştirmesini amaçlamışlardır. 1 g üreaz tozu kumla karıştırılmış ve sonrasında kum numunelere 100 mL 0,5 M ve 1M üre-CaCl₂ çözeltisi enjekte edilmiştir. 0,5 M uygulanmış numunelerden %5,1 CaCO₃ varlığında 890 kPa serbest basınç mukavemeti elde edilirken 1M üre-CaCl₂ çözeltisi uygulanmış numunelerden ise 1.6 MPa serbest basınç mukavemeti elde edilmiştir. İyileştirilmiş numuneler üzerinde geçirimsizlik deneyleri yapılmış ve sonuç olarak numunelerin geçirimsizliğinde önemli derecede azalma olduğu görülmüştür.

Neupane *et al.* (2013), kum zeminin iyileştirilmesi için farklı üre- CaCl_2 ve üreaz konsantrasyonları kullanarak optimum karışım oranları araştırmışlardır. Optimum EICP çözeltisini elde etmek üzere 0.5 mol/L, 1 mol/L aralığında üre- CaCl_2 ve 0.5 g/L-4.0 g/L aralığında üreaz konsantrasyonları su ile karıştırılarak ayrı ayrı iki farklı çözelti hazırlanmıştır. Her iki çözeltiden 15'er mL alınarak tüplerde karıştırılmış ve toplam 30 mL çözelti elde edilmiştir. CaCO_3 'ın çökmesi birkaç dakika sonra gerçekleşmiş ve çöken kalsit birkaç saat içinde tüplerin dibine çökmüştür. 0.5 mol/L üre- CaCl_2 ve 2.0 g/L üreazden oluşan çözelti ile yaklaşık %80 çökme oranı elde edilmiştir. Böylece optimum üreaz konsantrasyonu, üreazın maliyeti ve çökme oranının üzerindeki etkisi dikkate alınarak 2 g/L olduğuna karar verilmiştir.

Park *et al.* (2014) yapmış oldukları çalışmada, üreden ayrıştırılan karbonat (CO_3^{2-}) iyonları, kalsiyum karbonatı çöktürmek için kalsiyum (Ca^{+2}) iyonlarıyla birleştirilmesi gerektiğinden kalsiyum klorür, kalsiyum hidroksit ve kalsiyum nitrat olmak üzere üç farklı kalsiyum kaynağının etkisini araştırmışlardır. Üreaz, üre ve farklı kalsiyum kaynaklarından oluşan çözeltiler zemin numunelerine uygulanmış ve iyileştirilen numuneler üzerine serbest basınç deneyi yapılmıştır. Kalsiyum klorür içeren numunenin serbest basınç mukavemetinin, kalsiyum hidroksit ve kalsiyum nitrat içeren numunelerden daha yüksek olduğu görülmüştür.

Knorr (2014) yapmış olduğu yüksek lisans tez çalışmasında, kum zeminin rüzgâr erozyonuna karşı yüzeyel stabilizasyonu için EICP yöntemini araştırmıştır. EICP çözeltisi zemine yüzeyden spreyle püskürterek uygulanmıştır. Uygulama yapılan numuneler 7 gün boyunca oda sıcaklığında kurutulmuş ve sonrasında rüzgâr tüneli analizi uygulanmıştır. Analiz sonucunda, sadece su uygulanan kontrol numunelerin yüzeyleri 8 m/sn rüzgâr hızında ayrılırken iyileştirilmiş zemin numunelerin yüzeyleri ise 25 m/sn'den daha yüksek bir rüzgâr hızında ayrıldığı görülmüştür. Çalışma sonucunda zeminlerin rüzgâr erozyonu kontrolünde EICP uygulamasının etkili bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Nam *et al.* (2015), laboratuavarda elde edilen Jack fasulyesinin ham ekstraktı ve ticari üreazın çökme deneyleri yaparak kalsiyum karbonat çökmesi üzerindeki etkileri araştırmışlardır. Deneyler sonucunda oluşan malzemeler üzerinde XRD ve SEM analizleri gerçekleştirilmiş ve oluşan yapının kalsit olduğu belirlenmiştir. Jack fasulyesinin ham ekstraktı ve saflaştırılmış üreazın neden olduğu kalsiyum karbonat oranları birbirine yakın %25-%30 arasında olduğu görülmüştür. Sonu olarak, jack fasulyesinden ham ekstrakt olarak elde edilen üreazın, kalsitin çökmesini neden olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Kavazanjain and Hamdan (2015), EICP yöntemi kullanılarak iki farklı kum zeminin (F-60 silis kumu ve Ottawa 20-30 kumu) mühendislik özelliklerini iyileştirilmeye amaçlanmıştır. EICP uygulama çözeltisi, 1,38 M üre, 1,58 M kalsiyum klorür, 0,4 g/L üreaz enzimi (ticari) ve

4 g/L yağsız süt tozundan oluşmuştur. 100 mL EICP çözeltisi karıştırma- sıkıştırma ve enjeksiyon yöntemleri kullanılarak 5,1 cm çapında ve 15,2 cm yüksekliğinde kalıplarda hazırlanan numunelere uygulanmıştır. Uygulama sonucunda Ottawa kumu numunesinden %2,82 CaCO_3 varlığında 529 kPa ve F-60 silis kumu numunesinden %4,3 CaCO_3 varlığında 392 kPa serbest basınç mukavemeti elde edilmiştir.

Putra *et al.* (2016), kalsit çökeltme işleminin verimliliğini artırmak için magnezyum klorürü bir katkı malzemesi olarak araştırmışlardır. Üre, CaCl_2 ve üreaz enzimden oluşan EICP çözeltisine farklı oranlarda magnezyum klorür katılarak çökeltme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, MgCl_2 'ün bir katkı malzemesi olarak kullanıldığında, kalsit çökeltme oranını %90'ına yükselttiğini göstermiştir. Ancak MgCl_2 içermeyen örneklerin çökeltme oranı %70 olarak elde edilmiştir. MgCl_2 , kalsit çökeltme hızının yavaşlatarak ve böylece kalsit miktarının artmasına neden olmuştur.

Carmona *et al.* (2016) yapmış oldukları çalışmada üre- CaCl_2 miktarının kalsiyum karbonat çökeltmesi üzerindeki etkisini analiz etmişlerdir. Çalışmada, üreaz enzimin (4kU/L) miktarı sabit tutulmuş ve üre ve kalsiyum klorür eşit molaritelerde (0,25 M, 0,5 M, 0,75 M, 1,0 M ve 1,25 M) tüplerde hazırlanarak kalsit çökeltme deneyleri yapmışlardır. Sonuç olarak, en düşük üre- CaCl_2 (0,25 mol/L) kullanılarak elde edilen çökeltme oranı yaklaşık %95 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca üre- CaCl_2 konsantrasyonunun artışı, kalsiyum karbonat çökeltmenin verimliliğini azalmasına neden olmuştur (yani çökeltme oranı azalmıştır) ve bunun sebebini de çözeltide bulunan ürenin bir kısmının üreaz tarafından hidrolize edilmediğinden kaynaklandığı bildirilmiştir. Optimum üre- CaCl_2 ve üreaz çözeltisinden oluşan EICP uygulama çözeltisi, karıştırma-sıkıştırma zemin hazırlama yöntemi kullanılarak kum zemin numunelere uygulanmış ve 14 gün sonra numuneler serbest basınç deneyine tabii tutulmuştur. Sonuçlar, üre- CaCl_2 konsantrasyonları artmasıyla serbest basınç dayanım değerlerinin düştüğünü göstermiştir. 0,25 mol/L üre- CaCl_2 ile iyileştirilmiş numunenin dayanımı 140 kPa iken 1,25 mol/L üre- CaCl_2 ile iyileştirilmiş numunenin dayanımı 50 kPa olarak elde edilmiştir.

Zhao *et al.* (2016), gevşek zeminin mekanik özelliklerini iyileştirmek ve aynı zamanda kalsiyum karbonatın reaksiyonu sırasında meydana gelen, zemin ve yeraltı suyunun kirlenmesine sebep olan amonyumun (NH_4^+) etkilerini azaltmak amacıyla EICP çözeltisine poliakrilik asit (PAA) eklemenin etkinliğini araştırmışlardır. Zemin olarak ince taneli silika kumu (F-60 silika kumu) kullanılmıştır. 1.0 M CaCl_2 , 1.500 M üre ve 0.450 mg / mL üreaz'dan oluşan EICP uygulama çözeltisi, kombinasyon halinde poliakrilik asit (PAA) hidrojel ile karıştırılarak kum zemin yüzeyine enjekte edilmiştir. Sonuç olarak, kum zeminin mukavemeti önemli ölçüde artmış ve elde edilen zemin kabukları 4.8×10^3 kPa kadar yüksek bir dayanım

değeri göstermiştir. Ayrıca zemine poliakrilik asit (PAA) eklemenin, kalsitin yan ürünü olan amonyumun %96'sını hareketsizleştirilmesine / giderilmesine neden olduğu bildirilmiştir.

Oliveira *et al.* (2016), enzim aracılı kalsit çökmesi (EICP) zemin iyileştirme metodunu farklı zemin sınıfları üzerinde uygulamışlardır. Çalışmada Siltli (SP-SM, kötü derecelenmiş kum zemin), iki farklı siltli kum (SM), kumlu bir silt (ML) ve kumlu organik bir silt (OL) olmak üzere beş ayrı zemin kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçları, kalsitin çökmesi, kumlu ve siltli zeminlerin mukavemetini %40 ile %106 arasında artırırken, organik zeminde ise zararlı bir etkiye neden olduğu görülmüştür. Araştırmacılar organik zeminin düşük pH değeri, zemin parçacıklarının organik kaplaması ile birlikte, bu tür zemine ilişkin EICP uygulamanın verimsizliğini açıklayan anahtar faktörler olduğunu bildirmişlerdir.

Putra *et al.* (2017 a), EICP çözeltisinde (üre, kalsiyum klorür ve üreaz enzim) magnezyum sülfatın ($MgSO_4$) bir katkı malzeme olarak etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, kötü derecelenmiş kum (SP) kullanılmış ve kum numuneler 5 cm çapında ve 10 cm yüksekliğinde polivinil klorür (PVC) kalıpları kullanılarak hazırlanmıştır. 0,02 ile 0,10 mol /L aralığında magnezyum sülfat konsantrasyonları, toplam 1,0 mol/L'lik $CaCl_2$ - $MgSO_4$ konsantrasyonu oluşturacak şekilde hazırlanmış ve daha sonra 1,0 mol /L üre ve 2 g/L üreaz enzimi ile karıştırılarak EICP çözeltisi elde edilmiştir. 75 mL EICP çözeltisi (gözenek hacmi) kum örneklerine uygulanmış ve uygulama işlemi 1-3 kez tekrarlanmıştır. Yapılan deneyler sonucunda çöken $CaCO_3$ kütlenin, magnezyum sülfat konsantrasyonu arttıkça arttığı görülmüştür. Ayrıca çöken malzemelerin kalsit, aragonit ve alçıtaşı olduğu XRD analizi ile tespit edilmiştir. Mineralojik analiz sonuçlarına göre magnezyum sülfatın üre, üreaz ve $CaCl_2$ 'den oluşan uygulama çözeltisine ilave edilmesi, reaksiyon hızını yavaşlatarak aragonit ve alçıtaşı oluşumunu sebep olmuştur. Magnezyum içeren numunenin mukavemetinin, magnezyum içermeyen numuneye oranla 2,5 kat daha fazla olduğu görülmüştür. %10'luk kalsiyum karbonat varlığında iyileştirilmiş numunelerden maksimum 0,6 MPa mukavemet elde edilmiştir.

Putra *et al.* (2017b), enzim aracılı kalsit çökmesi tekniğinde NH formlarının (amonyak ve amonyum) giderilmesi için doğal zeolitın uygulanabilirliğini değerlendirmişlerdir. Üre- $CaCl_2$ ve üreazdan oluşan hazırlanmış enjeksiyon çözeltilerine 10 g/L doğal zeolit ilave edilmiş ve 0,5, 1,0 ve 2,0 saatlik karıştırma süreleri için bir çalkalayıcı aleti kullanılarak karıştırılmıştır. Daha sonra, çözeltelerde gelişen NH-formlarının konsantrasyonları ölçülmüştür. Zeolit katılmanın çöken minerallerin miktarı ve mineralojik maddesi üzerindeki etkileri XRD ve SEM analizleri ile değerlendirilmiştir. EICP çözeltilerinde zeolit kullanımının NH-formlarının konsantrasyonunu azaltabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak EICP tekniğinde uygulama

  zeltisine zeolit katılması, iyileştirilmiş zemin mukavemeti üzerinde önemli bir etkisi olmadığı doğrulanmıştır.

Javadi *et al.* (2018), zemin iyileştirme için EICP metodunda kullanılan üreaz enzimin maliyetini düşürmek amacıyla ticari üreaz yerine üreaz aktivitesi açısından zengin bir tarım atığı olan karpuz tohumunun kullanımını araştırmışlardır. Enzimin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için düşük maliyetli yöntemler kullanılmıştır. Üreaz enzim ekstraksiyon işlemi, harmanlama, filtrasyon ve santrifüj yoluyla gerçekleştirilmiştir. Yapılan SEM ve XRD analizler sonucunda, karpuz tohumlarından çıkarılan üreaz enzim kalsiyum karbonat   kelmesini sağlamıştır.   ken kalsit içeriğinin teorik maksimuma oranı (PR) %64 civarında bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, düşük maliyetli ve ucuz bir yöntem kullanılarak karpuz tohumlarından çıkarılan üreazın zeminde kalsiyum karbonat   kelmesine neden olabileceğini göstermiştir.

Dilrukshi *et al.* (2018), yapmış oldukları çalışmada EICP zemin iyileştirme yöntemi ile küçük boyutlu zemin numunelerini iyileştirmek için üreaz enzimi karpuz (*Citrullus lanatus*) tohumundan elde etmişlerdir. Zemin stabilizasyonu için numuneler, kum zemin 35 ml'lik şırıngalara (23 mm çap) üç eşit tabaka halinde yerleştirilerek hazırlanmıştır. Zeminin boşluk hacmine denk gelen 13 mL EICP uygulama   zeltisi bir gün arayla 7, 14 ve 21 döngü halinde numunelere uygulanmıştır. 50 g/L üreaz (ham ekstrakt) ve 0,7 mol /L   re-CaCl₂ içeren EICP uygulama   zeltisi ve 14 döngü ile iyileştirilmiş numuneden en yüksek mukavemet (4 Mpa) elde edilmiştir. Çalışma sonucunda, karpuz tohumlarından elde edilen ham üreazın, kalsit   keltmesi için mevcut ticari üreazın yerine kullanım potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Almajed *et al.* (2018a), kalsiyum karbonat   kelmesini en üst düzeye çıkarmak için optimum EICP uygulama   zeltisini araştırmış ve iki farklı zemin hazırlama yöntemlerini kullanarak zemini iyileştirmeyi amaçlamışlardır. Optimum EICP uygulama   zeltisini elde etmek için farklı konsantrasyonlarda   re, kalsiyum klorür ve üreaz kullanarak tüplerde deneyler gerçekleştirmişlerdir. Deneyler sonucunda, 0,67 M kalsiyum klorür, 1 M   re ve 3 g /L   reaz enziminden oluşan   zelti,   kelme oranları ve enzim maliyeti dikkate alınarak optimum EICP   zeltisi olarak belirlenmiştir. Optimum EICP uygulama   zeltisi, iki farklı zemin uygulama yöntemleri kullanılarak kum numunelere uygulanmıştır. Dört numune s  z  lme zemin hazırlama yoluyla hazırlanmış, kuru kum yaklaşık %45'lik rölatif sıklıkta kalıplara yerleştirilmiş ve optimum EICP   zeltisi (1 M   re, 0,67 M kalsiyum klorür ve 3 g/L enzim) alt kısmı kapalı olacak şekilde numunelerin tepesinden s  z  lm  şt  r. Daha sonra numuneyi 7 gün boyunca farklı iyileştirme döngüleri ile (maksimum dört iyileştirme döngüsü) kurumaya bırakılmıştır. Diğer dört numune karışırma-sıkıştırma zemin hazırlama yoluyla hazırlanmış,

zemin 70 mL optimum EICP uygulama çözeltisi ile karıştırılmış ve sonra kalıplara üç tabaka halinde sıkıştırarak yerleştirilmiştir. Karıştırma-sıkıştırma yöntemi ile hazırlanmış numunelerde çimentolama oluşmadığı için serbest basınç mukavemetleri ölçülememiştir. Öte yandan, süzme yöntemi ile işlenmiş numunelerden 99 kPa - 465 kPa aralığında serbest basınç dayanımları elde edilmiştir.

Almajed *et al.* (2018 b) yapmış oldukları çalışmada, EICP ile iyileştirilecek zeminlere belirli oranlarda sisal lif katılarak sisal lifin kalsit çökmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada EICP uygulama çözeltisi, 0,5 M kalsiyum klorür, 0,875 M üre ve 0,85 g/L üreaz enziminden oluşturulmuştur. % 0,0, % 0,2, %0,3, %0,4, %0,75 ve %0,85 (lifin kum ağırlığına yüzdelik oranı) oranlarında ve 10 mm ile 20 mm uzunluklarında sisal lif kullanılmışlardır. Erken kalsit çökmesini önlemek için üre-CaCl₂ çözeltisi ve üreaz çözeltisi ayrı ayrı kaplarda hazırlanmış ve zemine uygulanmadan hemen önce karıştırılmıştır. Zemin numunelerin hazırlanması için 51 mm çapında x 127 mm yüksekliğinde akrilik kalıplar kullanılmıştır. 380 g kum, farklı oranlarda lif, 85 EICP uygulama çözeltisi ile karıştırılarak homojen bir şekilde üç eşit tabaka halinde kalıba yerleştirilmiştir. Sonuç olarak optimum lif içeriği (%0,3 lif oranında ve 10 mm uzunluğunda) ve EICP çözeltisi ile iyileştirilmiş kum zemin, lif olmadan sadece EICP ile iyileştirilmiş kum zeminden 4 kat daha fazla mukavemet değeri vermiştir. 20 mm uzunluğundaki liflerin kullanılması durumunda, numunelerde çimentolamayı engellemiş olmasından dolayı EICP ile uygulanacak zeminin mukavemetini arttırmak için kullanılan lifin, sınırlı bir uzunluğuna sahip olması gerektiği bildirilmiştir.

Putra *et al.* (2018), enzim aracılı kalsit çökmesi uygulamasının kumlu zeminin kayma dayanımı parametreleri (içsel sürtünme açısı ve kohezyon) üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Kalsiyum klorür, üre, magnezyum sülfat ve üreaz enziminden oluşan EICP çözeltisi kum zemin numunelere uygulanmış ve iyileştirilen numunelerin kohezyon ve içsel sürtünme açısının değişimi, doğrudan kesme deneyleri ile değerlendirilmiştir. Yapılan uygulama sonucunda zeminlerde oluşan kalsitin, kohezyonun iyileştirilmesinde önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür. İyileştirilmiş kum zemin kütlesinin %4,1'ini oluşturan CaCO₃ varlığı, 53 kPa'lık bir kohezyon oluşturmuştur. Bununla birlikte, EICP uygulanmasının, sürtünme açısı üzerinde önemli bir etkisi olmayıp iyileştirilmiş ve iyileştirilmemiş kumlu zeminlerde benzer bir sürtünme açısı elde edilmiştir.

Almajed *et al.* (2019), çalışmalarında kalsitin zemin içerisinde homojen olarak dağılmasını sağlamak için EICP uygulama çözeltisinde katkı malzemesi olarak yağsız süt tozu kullanmışlardır. Zemin iyileştirme için çözelti 1 (1,0 M üre, 0,67M CaCl₂ ve 3 g /L enzim), çözelti 2 (1,0 M üre, 0,67M CaCl₂, 3 g /L enzim ve 4 g /L yağsız süt tozu) ve çözelti 3 (0,37M

üre, 0,25M CaCl_2 , 0,85 g/L enzim ve 4 g/L yağsız süt tozu) olmak üzere üç farklı EICP uygulama çözeltisi hazırlanmıştır. Her üç EICP çözeltisi için ayrı ayrı üç numune hazırlanmıştır. Numuneler, 350 g kuru kum 75 mL uygulama çözeltisi ile karıştırılmış ve üç tabaka halinde 5 cm çapında akrilik kalıplara yerleştirilerek hazırlanmıştır. İyileştirilmiş numunelerin mukavemeti serbest basınç deneyi ile elde edilmiştir. Sonuç olarak çözelti 2 ile iyileştirilmiş numunelerden 1,65MPa ve 1,82 MPa arasında ve çözelti 3 ile iyileştirilmiş numunelerden ise 0,94MPa-1,3MPa arasında serbest basınç mukavemetleri elde edilmiştir. Süt tozu katkısı olmayan çözelti 1 ile iyileştirilmiş numuneler 0,12 MPa-0,16 MPa arasında basınç mukavemeti vermişlerdir. EICP çözeltisine süt tozu ilave edilerek iyileştirilmiş numunelerin, süt tozu ilave edilmeden iyileştirilmiş numunelere oranla daha yüksek serbest basınç mukavemeti sergilediği görülmüştür. Ayrıca SEM analizine göre, yağsız süt tozu katkısı ile iyileştirilmiş numuneler katkısız numunelere göre daha büyük kalsiyum karbonat kristalleri ve zemin parçacıklar arasındaki temas noktalarında daha yüksek oranda kalsiyum karbonat çökmesine sebep olmuştur. Son olarak yağsız süt tozu bir katkı malzemesi olarak kullanıldığı zaman kalsiyum karbonat çökmesi reaksiyonun hızını yavaşlatarak kalsitin zemin içerisinde homojen olarak dağılmasını sağlayabileceği bildirilmiştir.

Miftah *et al.* (2019) yapmış oldukları çalışmada, EICP ile doğal sahil kum zeminlerini iyileştirmeyi amaçlamışlardır. Kum numunesi kalıplara üç tabaka halinde dökülerek her tabaka, %60 rölatif sıklık olacak şekilde dört taraftan hafifçe sıkıştırılmıştır. Her döngüde gözenek hacmi miktarınca hazırlanan EICP çözeltisi (1mol üre, 0,67 mol CaCl_2 , 4 g/L yağsız süt tozu ve 10 mL/L enzimden oluşan çözelti) numunelerden süzölmüştür. Numunelerin, mukavemet artışını değerlendirmek için serbest basınç deneyi yapılmıştır. Deneye tabi tutulan numunelerden %1,96, %2,98 ve %3,69 kalsiyum karbonat içeriğinde sırasıyla 145 kPa, 241 kPa ve 483 kPa serbest basınç mukavemeti değeri elde edilmiştir. Zeminin mukavemeti ve kalsit içeriğinin uygulama döngü sayısının artmasıyla artışı bildirilmiştir.

Cuccurullo *et al.* (2019) yapmış oldukları çalışmada, EICP zemin iyileştirme yöntemi ile iyileştirilmiş siltli kil zemini suya maruz bırakarak erozyona karşı dayanımını incelemek için suya daldırma deneyleri yapmışlardır. Bu çalışmada, üreaz enzimin ticari olarak elde edilmesi pahalı olduğu için enzimi santrifüjleme yoluyla ham üreaz özütü olarak soya fasulyesinden çıkarılmıştır. Daha sonra, kalsit çökmesini en üst düzeye çıkarmak ve optimum üre- CaCl_2 konsantrasyonlarını elde etmek üzere çökme deneyleri yapmışlardır. Deney sonuçlarından, özellikle pH, elektriksel iletkenlik ve çökme oranı ölçümlerini dikkate alınarak en yüksek kalsit çökmesine yol açan optimum üre ve CaCl_2 konsantrasyonu 2,5 mol/L olarak belirlenmiştir. Çökme deneylerinden sonra zemin stabilizasyonu için EICP çözeltisi, ham

fasulye ekstraktı, optimum üre ve CaCl_2 konsantrasyonu (2,5 mol/L) ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Ham fasulye ekstraktı miktarı ile ilgili herhangi bilgi verilmemiştir. Kontrol ve iyileştirilecek zemin numuneleri, 50 mm çap ve 100 mm yüksekliğe sahip silindirik kalıplarda standart proktor ile hazırlanmıştır. Uygulamadan sonra tüm numuneler, 25 ° C'lik bir sıcaklığa ve $\pm 5\%$ 'lik bir bağıl neme karşılık gelen laboratuvar ortamında bir hafta bekletildikten sonra suya daldırma deneylerine tabi tutulmuştur. Numunelerin başlangıç kütleleri (m_i) kaydedildikten sonra on dakika suya daldırılmış ve daha sonra numuneler su banyosundan çıkarılarak daldırma öncesi ile aynı nem içeriğine ulaşabilmeleri için tekrar laboratuvar ortamında bir süre bekletilmiştir. Daha sonra numunenin son kütlesi (m_f) ölçülmüş ve daldırma sırasında kütle kaybı yüzdesini ($\% \Delta m$) Eşitlik 8 ile hesaplanmıştır. Daldırma sırasında, kontrol numunelerin kütle kaybı $\%43$ ve iyileştirilmiş numunelerin kütle kaybı $\%13$ olarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda siltli kil zeminlerin su erozyonu kontrolünde EICP uygulamasının etkili bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

$$\% \Delta m = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (10)$$

Baiq *et al.* (2020), kalsit çökmesi için ticari üreaz yerine kullanılabilecek üreaz içeren bitki kaynaklarını araştırmışlardır. Bu çalışmada, lahana ve soya küspesinden elde edilen ham ekstraktların ve ticari üreaz enzim ürünlerinin kalsit çökeltme etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Ham ekstraktların ve ticari üreazın etkisini belirlemek ve malzeme çökmesini değerlendirmek için tüp deneyleri yapılmıştır. Lahana ve soya küspesinin ham ekstraktları ile elde edilen ortalama çökeltme oranları ($\%40$ - $\%60$), saflaştırılmış üreazın (ticari ürün) çökeltme oranının yarısından daha fazla olduğu görülmüştür. Sonuç olarak lahana ve soya küspesinin ham ekstraktlarının , EICP yönteminde ticari üreaz yerine kullanılabilecek potansiyel kaynaklar olduğu sonucuna varılmıştır.

Lee and Kim (2020) çalışmalarında, iki farklı üreaz kaynakları olan bakteri ve soya fasulyesi kullanarak MICP ve EICP zemin tekniklerini karşılaştırmışlardır. Bakteri olarak *Sporosarcina pasteurii* kullanılmış ve soya fasulyesinin üreazı laboratuvarında ham ekstrakt olarak elde edilmiştir. Tekniklerin karşılaştırılması kalsiyum karbonat çökeltme deneyleri yapılarak gerçekleştirilmiştir. Deneylerden elde edilen sonuçlara göre, EICP'nın kalsit çökeltme verimliliği açısından MICP'den daha iki bir teknik olabileceği bildirilmiştir. Ek olarak, sarı soya fasulyesinden elde edilen üreaz enzimin etkinliği, kum zemin numunelerin mukavemeti üzerindeki etkisi, serbest basınç mukavemeti (UCS) ve değişen solüsyon molariteleri ve uygulama süreleri ile çökelen kalsiyum karbonat miktarı ölçülerek araştırılmıştır. Serbest basınç deneylerinin sonuçları, üre- CaCl_2 çözeltisinin molaritesi 1.5 M'den az olduğunda, numunelerin mukavemet artışı üzerinde önemli bir etkisi olmadığını

göstermiştir. Bununla birlikte, üre – CaCl_2 çözeltisinin molaritesi 3M olduğunda, numunelerin basınç dayanımı uygulama (7, 14, 21, 28 gün) süresi ile artmış ancak çöken kalsiyum karbonat içeriği uygulama süresinden etkilenmemiştir. Sonuç olarak, sarı soya fasulyesinden elde edilen üreazın zeminde kalsiyum karbonat çökmesine neden olabileceği sonucuna varılmıştır.

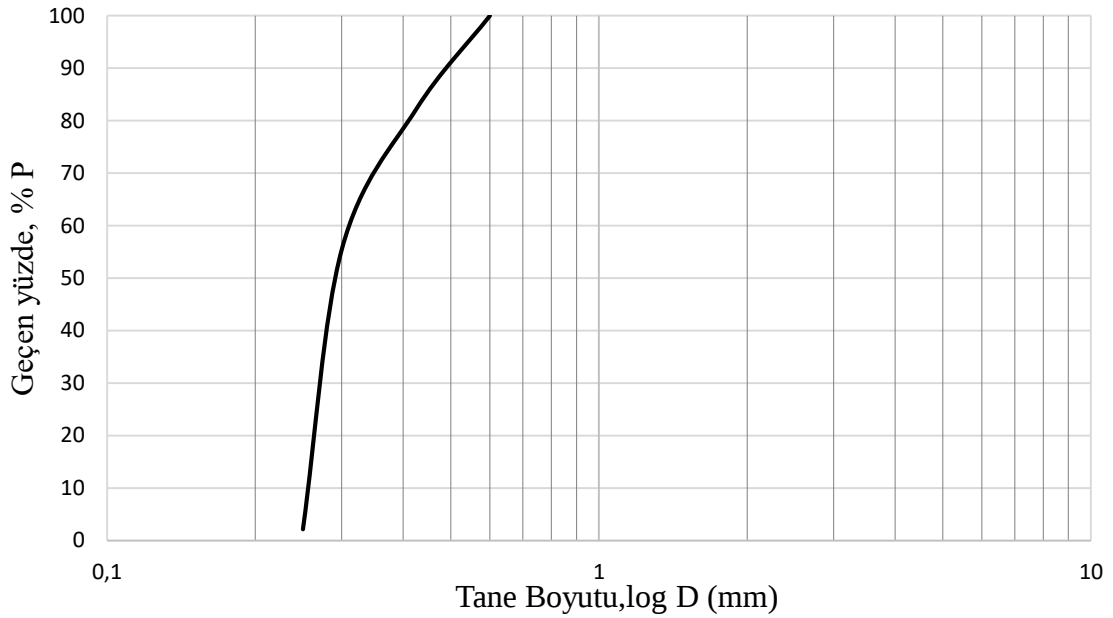


MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Deneylerde kullanılan kumun özellikleri

Çalışma kapsamında ticari silis kumu kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan kum zemine ait dane çapı dağılımı ve geoteknik özellikleri Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Zemin Mekaniği ve Geoteknik Mühendisliği Laboratuvarında belirlenmiştir. Kum zemin için ASTM E 11 standardına göre yapılan elek analizine göre tane çapı dağılım eğrisi Şekil 6’da ve indeks özellikleri Tablo 4’te verilmiştir. USCS zemin sınıflandırma sistemine göre deneylerde kullanılan zeminin sınıfı SP (kötü derecelenmiş kum zemin) olarak belirlenmiştir.



Şekil 6. Kum zemine ait granülometri eğrisi

Tablo 4. Deneylerde Kullanılan Kum Zeminin İndeks Özellikleri

Özellikler	Birim	Değer
Zemin sınıflandırması (USCS)		SP
Özgül ağırlık, G_s^a		2,65
Maksimum boşluk oranı, e_{max}		0,88
Minimum boşluk oranı, e_{min}		0,64
D_{10}	mm	0,26
D_{30}	mm	0,27
D_{60}	mm	0,34
Üniformluluk katsayısı, C_u^b		1,31
Derecelenme katsayısı, C_c^b		0,82

^aASTM D854-14, ^bASTM D2487-11

Deneylerde kullanılan çözeltiler

Üre çözeltisi

1 M üre (60,06 g/mol) çözeltisinin hazırlanması için 60,06 g üre tartılarak 100 mL saf su içinde çözülmüş, daha sonra toplam hacmi 1L'ye tamamlanmış ve aseptik ortam şartlarında 0,45 µm filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Üre çözeltisi +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Aseptik ortama ait görsel Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. Aseptik ortam

Magnezyum klorür ($MgCl_2$)

0,3 M $MgCl_2$ (95,211 g/mol) çözeltinin elde edilmesi için, 28,5633 g $MgCl_2$ tartılarak 100 mL saf suda çözülmüş ve daha sonra toplam hacmi 1L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Magnezyum klorür çözeltisi +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

Kalsiyum asetat ($C_4H_6CaO_4$)

0,6 M Kalsiyum asetat (158,17 g/mol) çözeltisinin hazırlanması için, 99,9 g kalsiyum asetat tartılarak 100 mL saf su içinde çözülmüş ve toplam hacmi 1L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

Kalsiyum nitrat ($Ca(NO_3)_2$)

0,6 M kalsiyum nitrat (164,08 g/mol) çözeltisinin hazırlanması için, 99,9 g kalsiyum nitrat tartılarak 100 mL saf su içinde çözülmüş ve toplam hacmi 1L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Kalsiyum nitrat çözeltisi +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Deneysel çalışmada kullanılan kimyasallar Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 8. Deneysel çalışmada kullanılan kimyasallar

Yöntem

Tez çalışmamız aşağıdaki aşamalardan oluşmaktadır:

- EICP tekniği ile zemin iyileştirmede kullanılacak üreaz aktivitesi yüksek olan bitkiler araştırılmış ve kavun tohumları kullanılmaya karar verilmiştir.
- Seçilen bitkinin (Kavun tohumunun) üreaz aktivitesi, Taguchi deney tasarımı uygulanarak Nessler yöntemi ile belirlenmiş ve üreaz aktivitesini etkileyen parametreler araştırılmıştır.
- Zemine verilecek optimum EICP uygulama çözeltisini ve kür süresini belirlemek için, kür süresi ve farklı konsantrasyonlarda üre ve üreaz enzim kullanılarak Taguchi metodu ile optimizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Kalsiyum klorürün konsantrasyonu sabit (0,6 mol/L) tutularak yapılan optimizasyon deneyleri sonucunda, en yüksek çökelme oranını veren üre, üreaz enzimi konsantrasyonları ve kür süresi belirlenmiştir.
- Optimizasyon sonucunda belirlenen üre, üreaz konsantrasyonları ve kür süresi kullanılarak, diğer kalsiyum kaynaklarının da (kalsiyum nitrat ve kalsiyum asetat) kalsit çökmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kalsiyum kaynaklarının konsantrasyonu kalsiyum klorür ile aynı seçilmiştir. Ayrıca, magnezyum klorürün bir katkı olarak EICP'nin üzerine etkisi araştırılmıştır.

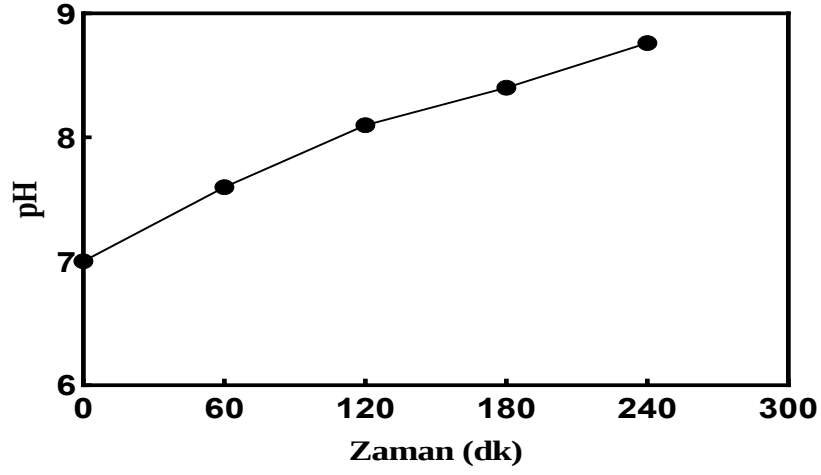
- Optimum EICP uygulama çözeltisi ve diğer uygulama çözeltiler üç farklı yöntem kullanılarak zeminlere uygulanmış ve zeminin mühendislik özellikleri araştırılmıştır.
- Son olarak EICP uygulama sonucunda, iyileştirilmiş zemin numunelerinin mukavemetini belirlemek için serbest basınç deneyi, oluşan kalsit yüzdeleri belirlemek amacıyla kalsit içeriği deneyi, uygulama sonucunda oluşan yapıların belirlenebilmesi amacıyla da SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ve EDX (Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi) analizleri gerçekleştirilmiştir.

Üreaz enziminin ekstraksiyonu

Literatürde kalsiyum karbonat çökmesinde kullanılmak üzere üreaz enzimi Jack fasulyesi, soya fasulyesi, lahana, soya küspesi gibi üreaz içeren farklı bitkilerden saflaştırılmadan ham üreaz veya ekstrakt olarak elde edilmiştir. Çalışmamızda literatürden farklı olarak kavun tohumları üreaz enzim kaynağı olarak seçilmiş ve üreaz enzim ham ekstrakt olarak elde edilmiştir.

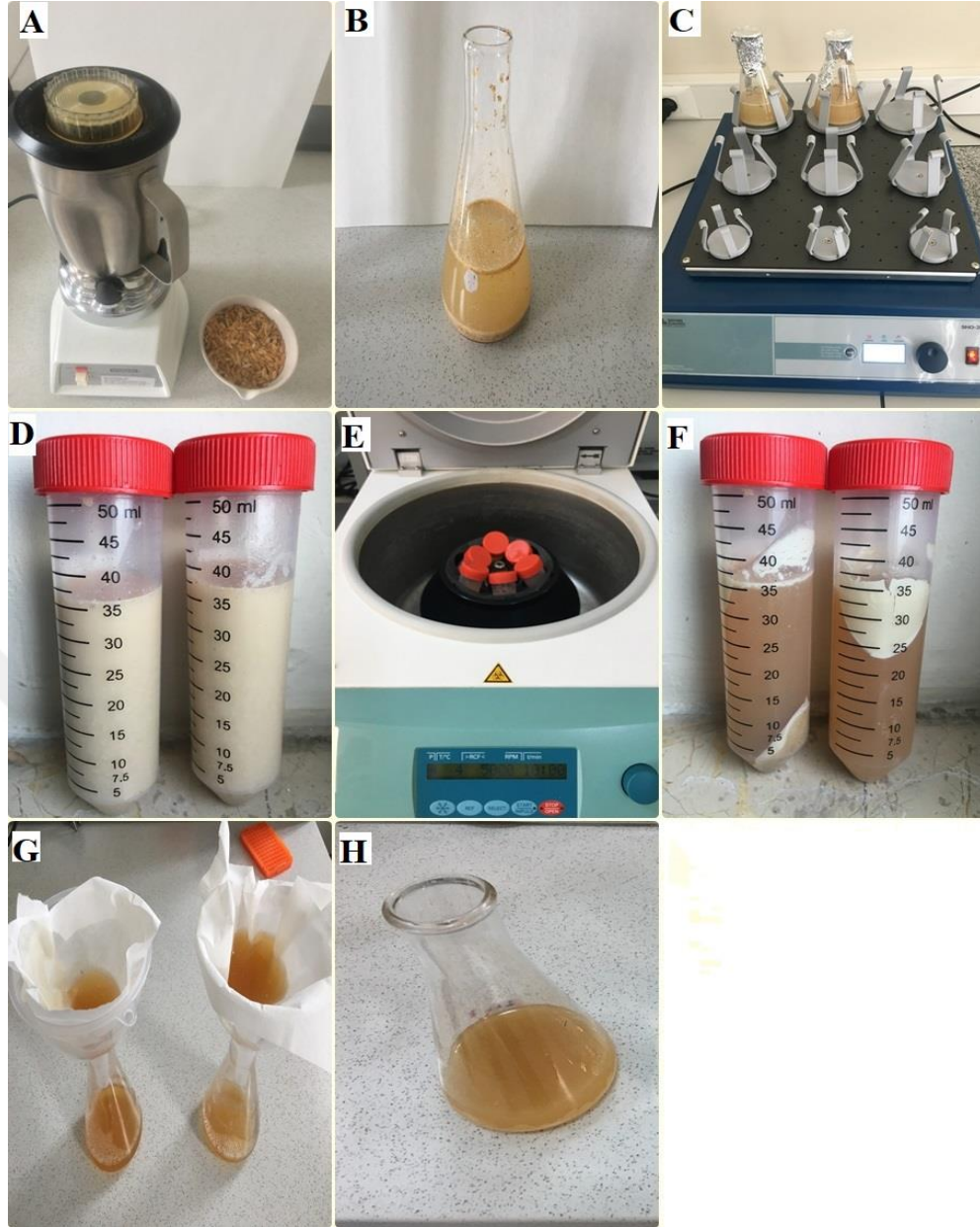
Üreaz enzim ekstraksiyon deneyleri, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Laboratuvarı ve DAYTAM'da yapılmıştır. 1g kavun tohumu blender kullanılarak ince bir şekilde öğütülmüştür. Öğütülmüş tohum çalkayıcı aleti kullanılarak 150 rpm'de 10 mL saf su ile bir saat boyunca karıştırılmıştır. Karıştırmadan sonra elde edilen çözeltinin katı ile sıvısını ayırt etmek için 5000 rpm, 4 °C sıcaklığında 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve daha sonra çözeltilerin çözülmemiş partiküllerini uzaklaştırmak için filtre kâğıdı kullanılarak süzölmüştür. Süzölme sonrasında elde edilen ham ekstrakt çözeltisi, saflaştırılmadan üreaz enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Üreaz enzim çözeltisinin hazırlama aşamaları Şekil 10'da verilmiştir. Kavun tohumlarından elde edilen üreaz enzimin konsantrasyonu (g/L), 1 litre saf su başına öğütülmüş kavun tohumu ağırlığı olarak ifade edilmiştir.

Üreaz enziminin kullanmanın temel amacı üreyi amonyum ve karbonata parçalamak ve çözeltinin pH'sının artmasına yardımcı olmaktır (Dilrukshi 2017). pH'taki artış, kalsit çökmesine yol açan önemli bir faktördür (Castanier *et al.* 1999). Bu nedenle kavun tohumundan elde edilen üreaz enziminin, çözeltinin pH'sı üzerindeki etkisini araştırmak için 0,4 M olarak hazırlanan üre çözeltisine 100 g/L konsantrasyona sahip üreaz enzimi eklenerek üre-üreaz çözeltisindeki pH'nın zamansal değişimi ölçülmüş ve sonuçları Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. Üreaz-üre çözeltisinin pH'ın zamanla değişimi

EICP'de üre hidrolizi veya kalsiyum karbonat çökmesi reaksiyonu, 6,5-8,5 pH aralığında gerçekleşmektedir. Şekil 9'da gösterildiği gibi kavun tohumlarından elde edilen üreaz, üre çözeltisinin pH'sını üç saat içinde 7,0'den 8,76'a kadar artırmıştır. Bu sonuç, kavun tohumlarından elde edilen üreazın, kalsiyum karbonat çökmesinde kullanılabileceği görülmüştür.



Şekil 10. Üreaz enzim çözeltisinin hazırlama aşamaları:(A) Kavun tohumunun öğütülmesi, (B) öğütülmüş tohumun saf su ile karıştırılması, (C) çözeltinin çalkalanması, (D) çalkalanma işleminden sonra çözeltinin görünüşü, (E) çözeltinin santrifüjlenmesi, (F) santrifüjlenme işleminden sonra çözeltinin görünüşü, (G) çözeltinin filtrelenmesi ve (H) filtrelenme işleminden sonra ham ekstraktın (üreaz enzim) son hali

Üreaz aktivitesi tayini ve optimizasyonu

Çalışmamızda Kavun tohumlarından elde edilen üreaz enzimin üreaz aktivitesi, Nessler yöntemi kullanılarak açığa çıkan amonyağın miktarının belirlenmesiyle tayin edilmiştir (Imada *et al.* 1973, Bülbül 2012). Üreaz enzim aktivitesi üzerine etki eden parametrelerin seviyeleri belirlenirken Taguchi optimizasyon yöntemi kullanılmıştır Seçilen parametreler ve bu parametrelerin seviyeleri Tablo 5’te verilmiştir.

Çalışmada, üreaz konsantrasyonu, enzimin ekstraksiyonu sırasında karıştırma süresi ve santrifüj süresi, sıcaklık ve inkübasyon zamanı olmak üzere 5 parametre seçilmiş ve her bir parametre için 5 seviye belirlenmiştir. Üre konsantrasyonu 1M olarak sabit tutulmuştur.

5 parametrelili ve 5 seviyeli L25 ortogonal dizin Tablo 6’da verilmiştir. Seçilen ortogonal dizine göre hazırlanan üreaz-üre karışımlar laboratuvarında her bir deney için 3 adet hazırlanmıştır.

Tablo 5. Üreaz Aktivitesi Tayini İçin Belirlenen Parametreler ve Seviyeleri

Faktör	Parametre	Birim	Seviyeler				
			1	2	3	4	5
A	Enzim	g/L	10	30	50	70	100
B	Karıştırma Süresi	dk	5	10	15	30	60
C	Santrifüj Süresi	dk	5	10	15	20	30
D	Sıcaklık Derecesi	°C	20	30	40	50	60
E	İnkübasyon zamanı	dk	5	15	30	60	240

Tablo 6. Üreaz Aktivitesi Tayini İçin Taguchi Metodu İle Belirlenen L25 Ortogonal Dizin

Deney No	Enzim (g/L)	Karıştırma Süresi (dk)	Santrifüj Süresi (dk)	Sıcaklık Derecesi (°C)	İnkübasyon zamanı (dk)
1	10	5	5	20	5
2	10	10	10	30	15
3	10	15	15	40	30
4	10	30	20	50	60
5	10	60	30	60	240
6	30	5	10	40	60
7	30	10	15	50	240
8	30	15	20	60	5
9	30	30	30	20	15
10	30	60	5	30	30
11	50	5	15	60	15
12	50	10	20	20	30
13	50	15	30	30	60
14	50	30	5	40	240
15	50	60	10	50	5
16	70	5	20	30	240
17	70	10	30	40	5
18	70	15	5	50	15
19	70	30	10	60	30
20	70	60	15	20	60
21	100	5	30	50	30
22	100	10	5	60	60
23	100	15	10	20	240
24	100	30	15	30	5
25	100	60	20	40	15

Çalışmada üreaz enzimin aktivitesini belirlemek amacıyla 0,5 mL 1M üre çözeltisine 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0), 0,5 mL saf su ve 0,5 mL üreazı (ham ekstrakt) eklenmiş ve hazırlanan çözeltinin enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi için 20, 30, 40, 50 ve 60°C sıcaklıklarda ve 5, 15, 30, 60 ve 240 dakikalarda inkübe edilmesine izin verilmiştir. Reaksiyon 0,5 mL 1,5 M trikloroasetik asit (TCA) eklenerek sonlandırılmıştır. Çözeltiden alınan 0,1 mL'lik numune 3,7 mL destile suya karıştırıldıktan sonra 0,2 mL Nessler reaktifi ilave edilmiştir. Reaksiyon sonucu oluşan NH_4^+ iyonları ile Nessler reaktifinin etkileşmesi için 10 dakika beklenilmiş ve daha sonra oluşan renk şiddeti 450 nm'de köre karşı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Açığa çıkan amonyağın miktarı kalibrasyon grafiği (Şekil 12) yardımıyla belirlenmiştir. Bir ünite enzim aktivitesi 1 mL reaksiyon karışımında 1 dakikada açığa çıkan 1 μmol amonyak miktarı olarak hesaplanmıştır. Üreaz aktivite tayininde kullanılan spektrofotometre aleti Şekil 11'de verilmiştir.



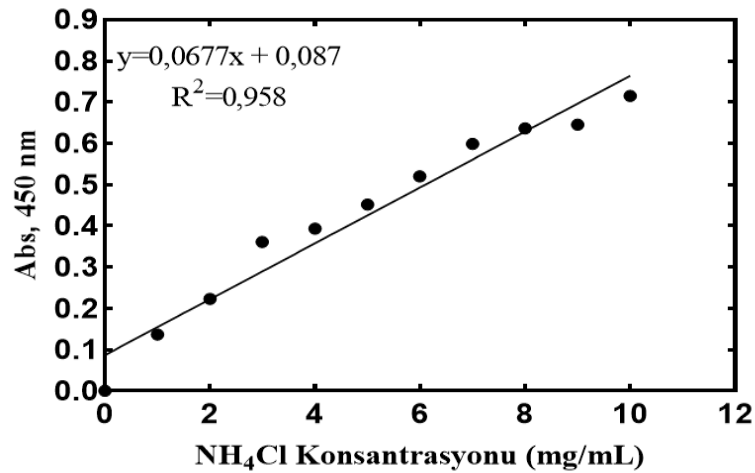
Şekil 11. Üreaz aktivite tayininde kullanılan Spektrofotometre aleti

Kavun tohumlarından elde edilen üreazın aktivitesini belirlemek için enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan NH_4^+ iyonlarının miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Bunun için, amonyumun standart grafik çizilmiş üreaz aktivitesinin değeri bulunmuştur. Amonyumun standart grafiğinin çizilmesi için 10,0 mg/mL'lik amonyum klorür stok çözeltisi hazırlanmıştır. Elde edilen stok çözeltinin seyreltilmesi ile 0,0, 0,5 1,0, 2,0, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 ve 5 mg/mL'lik standart çözeltileri hazırlanmıştır (Tablo 7).

Tablo 7. Amonyum Klorür (NH₄Cl) Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

NH ₄ Cl Standart Konsantrasyonu (mg/mL)	Standart Çözeltilerin Hacmi (mL)	Saf Su (mL)	Toplam Hacim (mL)
0	0	5	5
1	0,5	4,5	5
2	1	4	5
3	1,5	3,5	5
4	2	3	5
5	2,5	2,5	5
6	3	2	5
7	3,5	1,5	5
8	4	1	5
9	4,5	0,5	5
10	5	0	5

Tablo 7’de gösterilen şekilde hazırlanan standart amonyum klorür çözeltilerinin her birinden 0,1 mL alınmış ve 3,7 mL saf su ve 0,2 mL Nessler reaktifi eklenmiş daha sonra reaksiyonun gerçekleşmesi için 10 dakika bekletilmiştir. 3,8 mL saf su ve 0,2 mL Nessler reaktifinden oluşan köre karşı her biri için ayrı ayrı 450 nm dalga boyunda UV spektrofotometresinde absorbans değerleri ölçülmüştür (Bülbül 2012). Amonyum klorür konsantrasyonuna karşı belirlenen absorbans değerleri (Abs) grafiği çizilerek standart eğri elde edilmiş ve Şekil 12’de gösterilmiştir. Her bir Amonyum klorür konsantrasyonu için işlemler en az 3 defa yinelenmiştir.

**Şekil 12.** 0-10 mg/mL içeren örneklerin amonyum analizi için kalibrasyon eğrisi

Bir ünite (U) üreaz aktivitesi, normal şartlar altında bir dakikada üre'de 1 μmol NH_4^+ iyonu açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmış ve üreaz aktivitesi toplam birim olarak U/mL cinsinden verilmiştir.

Amonyum iyonu konsantrasyonu Eşitlik 11 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Abs} = 0,0677 \times \text{N} \quad (11)$$

Burada;

Abs: Üreaz aktivitesi tayininde elde edilen absorbands değerleri

N :Numunelerin absorbandslarına karşılık gelen amonyum iyonu miktarı (mg/mL)

Şekil 12’de gösterilen standart amonyum klorür (NH_4Cl) eğrisi kullanılarak elde edilen amonyum iyonu konsantrasyonu (N) Eşitlik 12’de yerine yazılarak total ünite değeri (U/mL) hesaplanmıştır.

$$\text{Total Ünite (U/mL)} = \text{N} \times 1000 / t \times \text{MA} \quad (12)$$

Burada;

t: İnkübasyon zamanı (5,15, 30, 60 ve 240 dk)

MA: Açığa çıkan amonyum iyonunun molekül kütlesi (18 g/mol)

Kalsiyum karbonat çökelme (tüp) deneyi

Bu çalışmada zemin iyileştirilmesi için optimum EICP uygulama çözeltisini belirlemek için Taguchi optimizasyon yöntemi kullanılmıştır. 3 parametrelili ve 5 seviyeli bir tasarım için CaCl_2 konsantrasyonu 0,60 mol/L olarak sabit tutulmuş ve üre konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu ve kür süresi olmak üzere 3 parametre seçilmiştir. Parametreler seçilirken literatürden faydalanılmıştır. Seçilen parametreler ve bu parametrelerin seviyeleri Tablo 9’da verilmiştir. Deneyler için Taguchi optimizasyon yöntemi kullanılarak belirlenen 3 parametrelili ve 5 seviyeli L25 ortogonal dizin Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Kalsiyum Karbonat Çökelme Deneyi İçin Seçilen Parametreler ve Seviyeleri

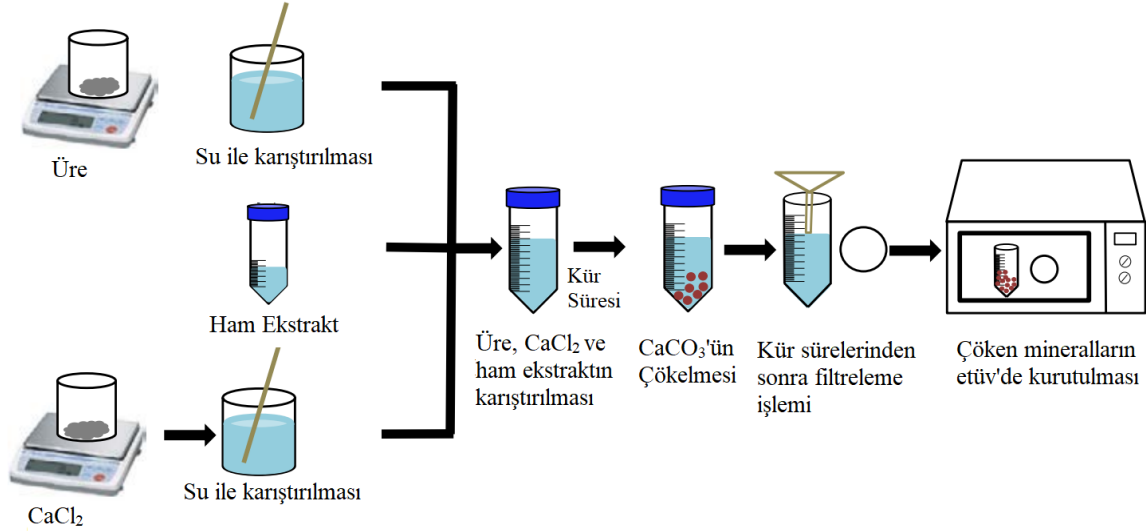
Faktör	Parametre	Birim	Seviyeler				
			1	2	3	4	5
A	Üre	mol/L	0,4	0,6	0,8	1	1,2
B	Enzim	g/L	40	60	80	100	120
C	Kür Süresi	Gün	1	2	3	5	7

Tablo 9. Kalsiyum Karbonat Çökelme Deneyi İçin Belirlenen L25 Ortogonal Dizin

Deney No	Üre (mol/L)	Enzim (g/L)	Kür Süresi (gün)
1	0,4	40	1
2	0,4	60	2
3	0,4	80	3
4	0,4	100	5
5	0,4	120	7
6	0,6	40	2
7	0,6	60	3
8	0,6	80	5
9	0,6	100	7
10	0,6	120	1
11	0,8	40	3
12	0,8	60	5
13	0,8	80	7
14	0,8	100	1
15	0,8	120	2
16	1	40	5
17	1	60	7
18	1	80	1
19	1	100	2
20	1	120	3
21	1,2	40	7
22	1,2	60	1
23	1,2	80	2
24	1,2	100	3
25	1,2	120	5

50 ml’lik şeffaf tüpler kullanılarak üre, CaCl_2 ve üreaz çözeltisinden oluşan toplam 75 adet numune hazırlanmıştır. 0,4-1,2 mol/L aralığında CaCl_2 çözeltisinden 5 mL alınarak 5 mL üre ile karıştırılmıştır. Hazırlanan 10 mL üre- CaCl_2 çözeltisine, 40-120 g/L aralığında üreazdan 10 mL alınarak karıştırılmış ve toplam 20 mL EICP çözeltisi elde edilmiştir. Üre, CaCl_2 ve üreazdan oluşan çözeltilerin 1, 2, 3, 5 ve 7 gün kür süreleri boyunca laboratuvar ortamında çökmesine izin verilmiştir. Kür süreleri sonunda çözeltiler, 11 μm çapına sahip filtre kağıdı

kullanılarak süzölmüştür. Filtre kağıdı üzerinde kalan malzemeler ve tüplerde kalan malzemeler 24 saat boyunca +60 ° C’de kurutulmuş ve daha sonra kurutulan malzemeler tartılarak çöken malzemelerin toplam ağırlığı elde edilmiştir. Kalsiyum karbonat çökelme deneyi prosedürü Şekil 13’te gösterilmiştir.



Şekil 13. Kalsiyum karbonat çökelme deneyi için prosedür (Baiq *et al.* 2020)

Çöken CaCO₃'ın toplam kütlesi teorik kütleyle bölünerek çözeltinin çökelme oranları elde edilmiştir. Çökelme oranları (PR) Eşitlik 13 ve 14 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Çökelme Oranı, PR (\%)} = \frac{M_p}{M_t} \times 100 \quad (13)$$

$$M_t = C \times V \times M \quad (14)$$

Burada;

M_p: Deneylerden elde edilen çöken malzemelerin ağırlığı (g)

M_t: CaCO₃'ün teorik kütlesi (g)

C: Kalsiyum klorürün sabit konsantrasyonu(0,6 mol/L)

V: Çözeltinin hacmi (L)

M: CaCO₃'ün mol kütlesi (100,087 g /mol)

Kalsiyum kaynağı ve MgCl₂'ün kalsiyum karbonat çökmesi üzerindeki etkileri

EICP zemin iyileştirme tekniğinde daha önce de belirtildiği üzere üreaz, üreyi karbonat ve amonyum iyonlarını ayrıştırır ve kalsiyum karbonatın çökebilmesi için üreden ayrıştırılan karbonat iyonlarının kalsiyum iyonları ile birleşmesi gerekmektedir. Literatürde mevcut olan çalışmaların çoğunda kalsiyum iyonların kaynağı olarak kalsiyum klorür (CaCl₂) kullanılmıştır. En yüksek çökelme oranı, 1,0 mol/L üre, 0,60 mol/L CaCl₂ ve 100 g/L ham üreaz kullanılmış çözeltinin 7 gün kür edilmesiyle elde edilmiştir. En yüksek kalsiyum karbonat çökmesi veren

çözeltilerdeki CaCl_2 yerine aynı konsantrasyonlarda farklı kalsiyum kaynakları (kalsiyum asetat ($\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$) ve kalsiyum nitrat ($(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2)$) kullanılarak kalsiyum karbonat çökelme deneyleri yapılmıştır. Ayrıca, en yüksek kalsiyum karbonat çökmesi veren çözeltilerdeki CaCl_2 'e % 0 ile % 50 aralığında MgCl_2 katılmış ve çökeltme üzerine etkisi araştırılmıştır. Deney programı Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Çökelme Deneyleri İçin Deney Programı

Deney kodu	Kalsiyum kaynakları (mol/L)			Magnezyum klorür (mol/L)
	Kalsiyum klorür	Kalsiyum nitrat	Kalsiyum asetat	
T1	0,6	-	-	0,00
T2		-	0,6	-
T3		0,6	-	-
T4	0,525	-	-	0,075
T5	0,45	-	-	0,15
T6	0,375		-	0,225
T7	0,3	-		0,30

Magnezyum klorür katkılı numunelerin hazırlanması için kalsiyum karbonat çökelme deneyinde olduğu gibi 5 mL CaCl_2 - MgCl_2 , 5 mL üre (1mol/L) ve 10 mL üreaz (100 g/L) şeffaf tüplerde karıştırılmış ve toplam 20 mL çözelti elde edilmiştir. Şeffaf tüpler 7 günlük kür süresi boyunca laboratuvar ortamında bekletilmiştir. Kür süresinden sonra çözeltiler filtre kağıdından süzülüş ve ardından hem filtre kâğıdı hem de şeffaf tüpler etüvde 24 saat boyunca $+60\text{ }^\circ\text{C}$ 'de kurutulmuştur. Daha sonra, filtre kağıdı üzerinde kalan ve şeffaf tüplerin dibinde kurutulmuş malzemeler tartılarak çöken toplam malzemelerin ağırlığı (M_p) belirlenmiş ve çökeltme oranları Eşitlik 13-14 ile hesaplanmıştır.

Çöken malzemelerin kristal fazları, kalsiyum kaynağı ve magnezyum klorürün kalsiyum karbonat oluşumu üzerindeki etkilerini incelemek için DAYTAM'da XRD analizi yapılmıştır.

Zemin numunelerin hazırlanması ve uygulama yönteminin seçimi

Zemin numunelerin hazırlanması için 5 cm çapında ve 15 cm yüksekliğinde pleksiglas (PVC) silindir kalıplar kullanılmış ve uygulama sonrasında numunelerin kalıplardan kolay bir şekilde çıkarılabilmesi için kalıplara asetat kağıdı yerleştirilmiştir. Uygulama çözeltisinin zemin içerisinde homojen bir şekilde dağılması için zemin numunelerin alt ve üst kısmına filtre yerleştirilmiştir. Daha sonra 250 g zemin PVC kalıplara %50 sıklıkla yerleştirilmiş ve

numunelerin yüksekliği 10 cm olarak ayarlanarak uygulama yapılmıştır. Uygulamada kullanılan zemin ve PVC kalıpları Şekil 14’te gösterilmiştir.



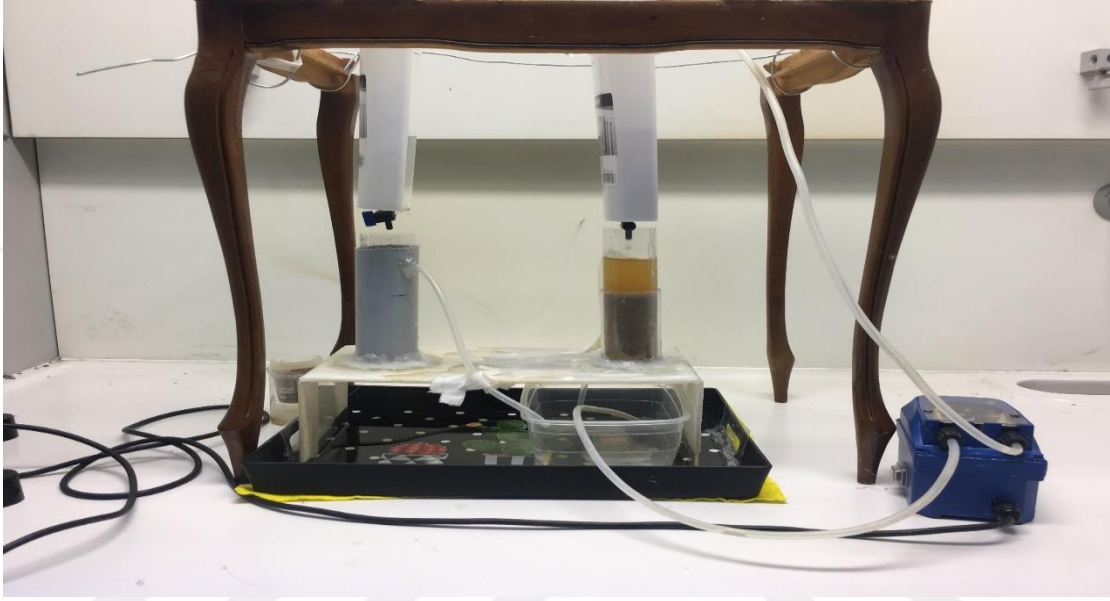
Şekil 14. Uygulamada kullanılan zemin ve PVC kalıpları

Kalsiyum karbonat çökelme deneyinde maksimum çökelme oranını veren (1,0 mol/L üre, 0,60 mol/L CaCl_2 ve 100 g/L üreaz) EICP uygulama çözeltisi $\text{Dr}=\% 50$ rölatif sıklıkta hazırlanmış zemin numunelerine uygulanmış ve iyileştirme üzerindeki etkileri incelenmiştir. Zemin iyileştirme deneylerinde kalsiyum kaynağı olarak kalsiyum klorür dışında kalsiyum asetat ve kalsiyum nitrat da kullanılmıştır. Ayrıca, farklı molaritede kalsiyum klorür ve magnezyum klorür kullanılarak magnezyumun iyileştirmedeki etkisi incelenmiştir. Zemin numunelere uygulanan EICP uygulama çözeltilerin içeriği Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11. Zemin Numunelere Uygulanan EICP Uygulama Çözeltilerin İçeriği

Deney Kodu	Kalsiyum Kaynağı	MgCl_2	Üre	Üreaz enzim (ham ekstrakt)
N1	0,6 M kalsiyum klorür	-	1 M	100 g/L
N2	0,525 M kalsiyum klorür	0,075 M	1 M	100 g/L
N3	0,45 M kalsiyum klorür	0,15 M	1 M	100 g/L
N4	0,375 M kalsiyum klorür	0,225 M	1 M	100 g/L
N5	0,3 M kalsiyum klorür	0,3 M	1 M	100 g/L
N6	0,6 M Kalsiyum Nitrat	-	1 M	100 g/L
N7	0,6 M Kalsiyum Asetat	-	1 M	100 g/L

EICP uygulama çözeltisinin zemine uygulanma yöntemi ön deneyler yapılarak belirlenmiştir. Birinci yöntemde, 250 mL üre-CaCl₂ ve 250 mL üreaz çözeltisi (ham ekstrakt) zeminlere uygulamadan önce karıştırılmış ve elde edilen 500 mL EICP uygulama çözeltisi hazne vasıtasıyla damlama şeklinde verilmiştir. Numunelerden sızan çözelti kaptı biriktirilmiş ve peristaltik pompalar kullanılarak tekrar üstteki hazneye iletilmiştir. Ayrıca, numunelerin geçirimsizliği azalmaya başladığında zeminlerin üst tarafından taşan çözelti hortumlar aracılığıyla alttaki kaba iletilmiştir. Bu çevrim 3 gün boyunca devam etmiştir (Şekil 15).

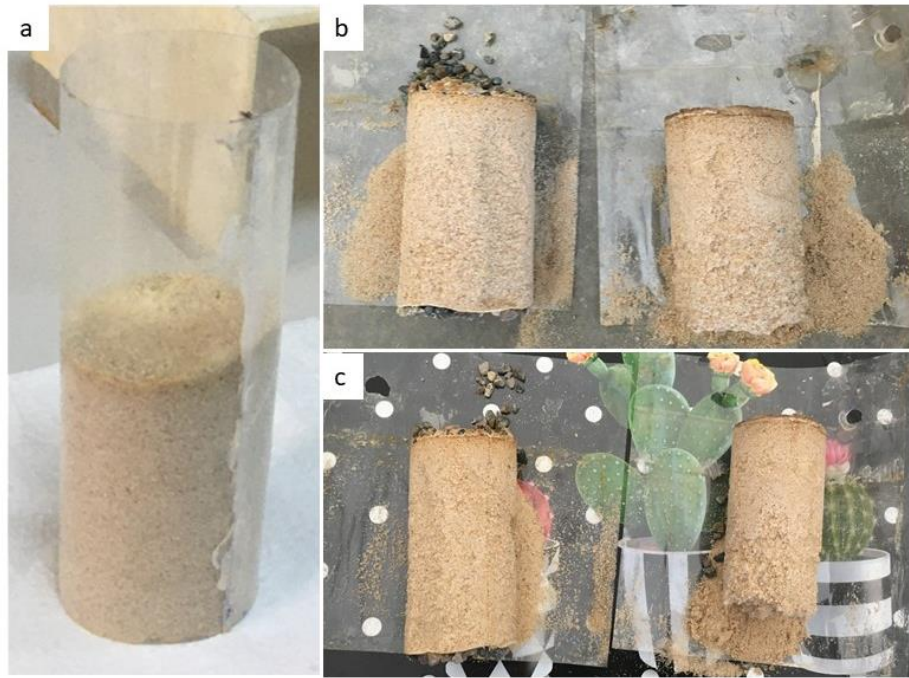


Şekil 15. Birinci yönteme kullanılan deney düzeneği



Şekil 16. Birinci yöntemin görselleri: (a) Üre-CaCl₂ ve üreaz enzim çözeltisi, (b) uygulama çözeltisi (c) uygulama çözeltisi verilen numuneler, (d) iyileştirilen numuneler

Birinci yöntemle yapılan uygulamalarda istenilen sonuca ulaşılamamış ve zemin geometrik şeklini koruyamamıştır (Şekil 16). İkinci yöntemde ise, birinci yöntemden farklı EICP uygulama çözeltisi bileşenleri (üre-CaCl₂ ve üreaz enzim çözeltisi) zeminlere ayrı ayrı uygulanmıştır. İlk önce 250 mL üreaz enzim çözeltisi zemine üstten verilerek zeminlerin doymun hale gelmeleri sağlanmış ve daha sonra 250 mL üre-CaCl₂ çözeltisi zeminlere verilmiştir. Sonrasında ilk yönteme benzer bir şekilde numunelerin altından çıkan çözelti peristaltik pompalar kullanılarak tekrar üstteki kaba ve üstten taşan sıvı hortumlar aracılığıyla alttaki kaba iletilmiştir. Bu çevrim 3 gün boyunca devam etmiştir. EICP çözeltisi ikinci yöntem ile uygulanan numunelerin görseli Şekil 17’de verilmiştir.



Şekil 17. İkinci yöntemin görselleri: (a) uygulamadan sonra kurutulmuş numune, (b) ve (c) kalıplardan çıkarılan numuneler

İki yöntemde de istenilen sonuçlara ulaşılamamıştır. Her iki yöntemde de Şekil 16 ve Şekil 17’de görüldüğü gibi kalsit numunelerin üst kısımlarında oluşarak biyo-tıkanmaya neden olmuş ve böylece numunelerde homojen dağılım elde edilememiştir.

Her iki yöntemde 500 mL uygulama çözeltisi tek döngü halinde zeminlere verilmesi, erken kalsiyum karbonat çökmesini neden olmuş ve böylece zemin numunelerin üst kısmını tıkayarak kalsitin numunelerin orta ve alt kısımlarına homojen dağılmasını engellediği düşünülmüştür. Bunun için zeminlerde erken kalsiyum karbonat çökmesini engellemek için, uygulama çözeltisi zeminlere yedi döngü halinde uygulamaya karar verilmiştir. Bu amaçla üçüncü uygulama yöntemi olarak literatürde EICP zemin iyileştirilmesinde sıkça kullanılan süzülme yöntemi kullanılmıştır. (Putra *et al* 2017a; Almajed *et al.* 2018a).

Üçüncü yöntemde, İlk olarak zeminin boşluk hacmi hesaplanmıştır. Zemin boşluk hacmine karşılık gelen 70 mL EICP uygulama çözeltisi, PVC kalıplarda hazırlanan numunelerin üstünden süzölmüştür. Süzölen çözelti bir gün arayla numunelerin altında bulunan vanadan boşaltılarak tekrar 70 mL çözelti numunelere eklenmiştir. Literatürde uygulama süresinin uzatılmasının zemin iyileştirmede üzerinde olumlu etkisinin olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle bu yöntemde ilk iki yöntemden farklı çevrim 7 döngü halinde 14 günde gerçekleşmiştir. Yedi farklı uygulama çözeltisi (Tablo 11) süzölme yöntemi ile 21 zemin numunesine uygulanmıştır. Bu yöntemle uygulanan numunelerin bazıları Şekil 18’de gösterilmiştir. Uygulama sonunda numuneler 7 gün boyunca 60 °C kurutulmuştur.



Şekil 18. Süzölme yönteminin uygulandığı numunelerin görselleri

Serbest basınç deneyi

Farklı EICP uygulama çözelti ile iyileştirilmiş kum zeminlerden 4,6 çapında ve 10 cm yüksekliğindeki numuneler üzerinde serbest basınç deneyi yapılmıştır. Yükleme hızı 0,8 mm/dk olarak seçilmiştir. Serbest basınç deneyleri ASTM D 2166 esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Serbest basınç deney aleti Şekil 19’da gösterilmiştir.



Şekil 19. Serbest basınç deney aleti

EICP uygulanmış zeminlerde kalsiyum karbonat içeriğinin belirlenmesi

İyileştirilmiş zeminlerin kalsiyum karbonat içeriği yüzde ağırlık fraksiyonuna göre belirlenmiştir. Zemin numunelerin kalsiyum karbonat içeriği, asit uygulanması sonucu oluşan ağırlık kaybı tekniği kullanarak tespit edilmiştir. Bu teknikte, iyileştirilmiş zeminlerden 5 g numune alınarak 105 °C sıcaklıkta kurutularak tartılır (W_1). Daha sonra kuru zeminde çöken kalsiyum karbonatın iyice çözülmesi için kabarcıkları bitene kadar 20 mL 1M hidroklorik asit (HCl) ilave edilir. Son olarak bu numune 11 um gözenek büyüklüğüne sahip filtre kağıdında saf su ile yıkanarak tekrar 105 °C sıcaklıkta kurutulur ve kuru zemin tartılır (W_2). Kalsiyum karbonat yüzdesi, hidroklorik asit ile yıkanmadan önceki kuru zemin + $CaCO_3$ (W_1) ve yıkanmadan sonraki kuru zemin (W_2) ağırlıkları Eşitlik 15’de yerine konularak hesaplanır (Hoang 2018).

$$\text{Kalsiyum karbonat yüzdesi (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_2} \times 100 \quad (15)$$

XRD (X-Işınları kırınımı) Analizi

XRD analizi, partikül maddelerin, killerin ve diğer minerallerin tespit edilmesini sağlar ve yapılarının mevcut fazları hakkında detaylı bilgiler sunar. Kalsiyum kaynakları ve magnezyum klorür kullanılarak yapılan kalsiyum karbonat çöklme deneyleri sonucunda oluşan yapılarının fazlarını belirlemek için DAYTAM’da XRD analizi yapılmıştır.

SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) analizi

SEM analizi ile yüksek büyütmelerde yüzey görüntüsü alabilmenin yanında malzemenin topografyası ve kimyasal kompozisyonu hakkında da bilgi edinilebilmektedir. Uygulama yapılan ve yapılmayan zeminlerin SEM görüntüleri DAYTAM’da yapılmıştır.

EDX (Enerji Dağılımlı X-Işını Spektrometresi) analizi

EDX analizi, SEM analiz işlemi sırasında yüzey malzemesinin daha iyi anlaşılması için gerçekleşir ve SEM analizi ile sağlanandan daha nicel bir sonuç verir. EDX analizinin bu çalışmada kullanmanın temel amacı, zemin numunelerde oluşan yapıların elementel bileşimi veya mineral dağılımı hakkında bilgi elde etmektir. Uygulama yapılan ve yapılmayan zeminlerin EDX analizi DAYTAM’ da yapılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Üreaz Aktivitesi Sonuçları

Üreaz aktivitesini etkileyen parametre (enzim konsantrasyonu, karıştırma ve santrifüj süresi, sıcaklık derecesi ve inkübasyon zamanı) seviyelerini belirlemek için Taguchi deneyi tasarımı kullanılmıştır. Üreaz aktivitesi Nessler yöntemi ile belirlenmiş ve üreaz aktivitesinin üst ve alt sınırı 0,352 U/mL- 59,90 U/mL olarak hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 12’de verilmiştir. Üreaz enzim aktivitesi için parametrelerin ortalama S/N etki oranları Tablo 13’ te gösterilmiştir.

Tablo 12. Üreaz Aktiviteleri ve Performans İstatistiği (S/N) Oranları

Deney No	Üreaz Aktivitesi (U/mL)	Performans İstatistiği S/N
1	7,714	17,746
2	4,103	12,262
3	1,723	4,726
4	0,889	-1,022
5	0,352	-9,069
6	1,381	2,804
7	0,280	-11,057
8	30,034	29,552
9	15,865	24,009
10	9,984	19,986
11	12,200	21,727
12	6,702	16,524
13	4,924	13,846
14	0,783	-2,125
15	35,122	30,912
16	1,245	1,903
17	26,260	28,386
18	16,576	24,390
19	10,011	20,010
20	5,252	14,406
21	5,881	15,389
22	5,033	14,037
23	1,436	3,143
24	59,905	35,549
25	15,482	23,797
ORTALAMA		14,073

Tablo 12’de verilen S/N değerleri ve Tablo 13’te verilen parametrelerin ortalama S/N etki oranları üreaz aktivitesi değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada, üreaz enzim aktivitesinin en yüksek olması istendiğinden analiz sırasında en büyük en iyi performans istatistiği kullanılmıştır. Dolayısıyla Tablo 13’te her bir parametrenin en yüksek S/N değeri, o parametre için optimum seviyeyi vermektedir. Hesaplanan en yüksek S/N değerleri; enzim 5. Seviyesinde (18,382), karıştırma süresi 5. seviyesinde (16,007), santrifüj süresi 5. seviyesinde (14,513), sıcaklık derecesi 2. seviyesinde (16,709) ve inkübasyon zamanı 1.seviyesinde (28,87) elde edilmiştir.

Tablo 13. Üreaz Enzim Aktivitesi İçin Parametrelerin Ortalama S/N Etki Oranları

Ortalama S/N Etkileri					
	Enzim	Karıştırma	Santrifüj	Sıcaklık	İnkübasyon zamanı
1. Seviye	4,93	11,914	14,807	15,166	28,429
2. Seviye	13,062	12,033	13,827	16,709	21,237
3. Seviye	16,177	15,132	13,073	11,518	15,327
4. Seviye	17,819	15,284	14,15	11,725	8,815
5. Seviye	18,383	16,007	14,513	15,252	3,438

Tablo 13’te verilen parametrelerin üreaz aktivitesi üzerindeki etkileri grafik olarak Şekil 20’de de gösterilmiştir. Grafiklerde bulunan düşey eksen, deneylerdeki ortalama S/N değerini ve yatay eksen de parametre seviyelerini göstermektedir.

Parametrelerin üreaz aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde Şekil 20a’da enzim konsantrasyonunun artması ile üreaz aktivitesinin de arttığı görölmüş ve optimum enzim konsantrasyonu 100 g/L olarak elde edilmiştir. Enzim konsantrasyonunun 1. seviyesi ile 5. seviyesi arasındaki farkın büyüklüğü bu parametrenin etki derecesini ifade etmektedir. Üreaz aktivitesi, enzim üreye doygun olduğu koşullarda enzim konsantrasyonuna bağlı olarak artar. Ortamda ne kadar çok enzim molekülü varsa yeterli üre olduğu sürece reaksiyon da devam edecektir.

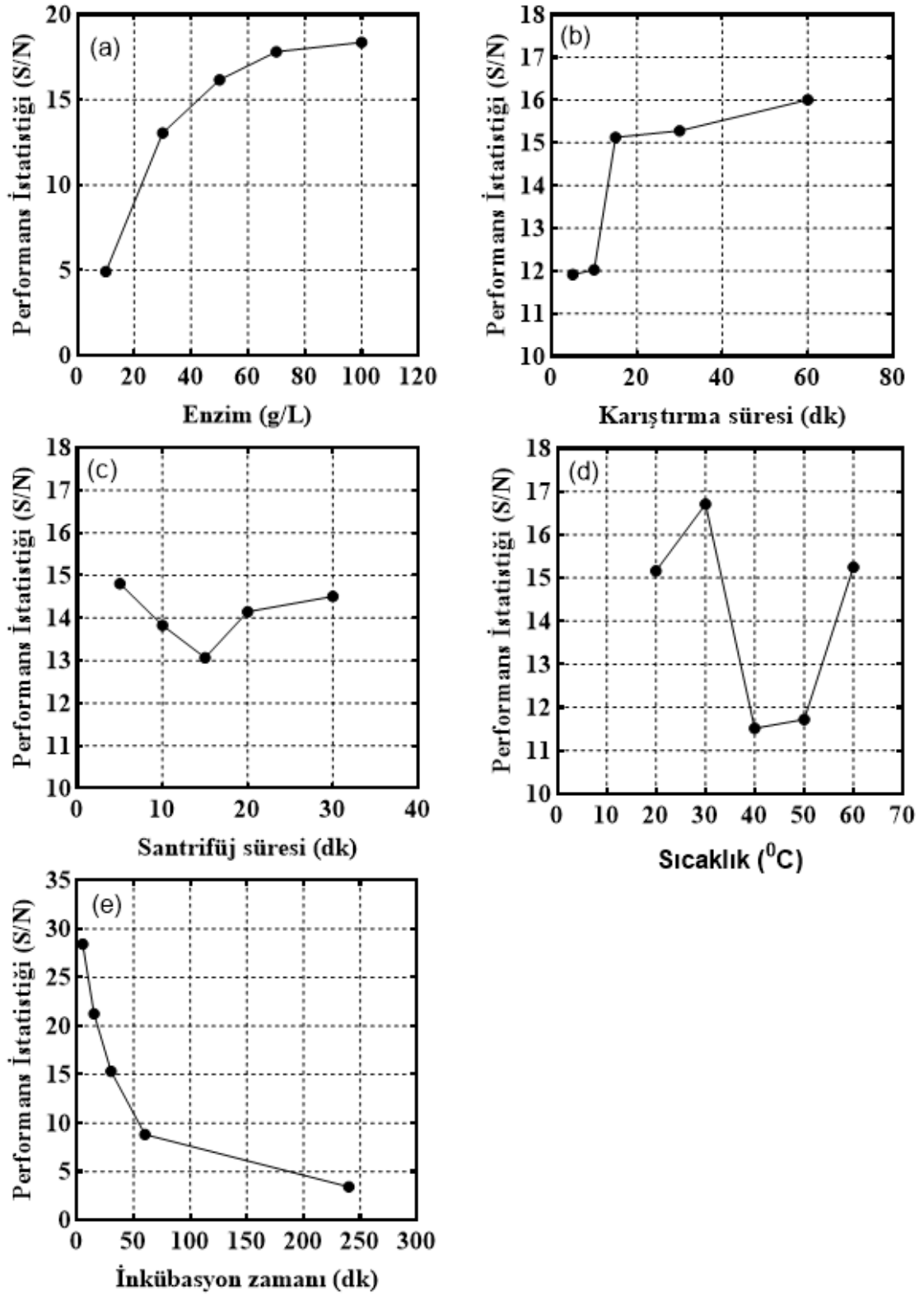
Şekil 20b incelendiğinde, karıştırma süresi, enzime benzer bir performans göstermiş ve karıştırma süresinin 5. seviyesi olan 60 dakikada üreaz aktivitesi en yüksek değere ulaşmıştır.

Şekil 21c’ye bakıldığında, maksimum üreaz aktivitesi, santrifüj süresinin 1. seviyesi olan 5 dakikada elde edilmiştir.

Şekil 20d incelendiğinde, sıcaklık derecesinin 2. seviyesi olan 30 °C’de üreaz aktivitesi en yüksek değere ulaşmıştır. Krishna *et al.* (2011), geniş bir sıcaklık aralığında çeşitli bitki kaynaklarından elde edilen üreaz enzimin aktivitesini incelemiş ve üreaz aktivitesi için optimum sıcaklığın 35 °C ile 50 °C arasında olduğunu bildirmişlerdir. Dilrukshi (2017) yapmış

olduğu çalışmada karpuz tohumundan elde edilen üreaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla 25-70 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde aktivite tayinleri gerçekleştirmiş ve optimum üreaz aktivitesini 50 °C sıcaklıkta elde etmiş ve bu sıcaklık derecesi değerinden sonra üreaz aktivitesinde önemli derecede azalma meydana geldiğini bildirmiştir. Bezelye (*pisum sativum L*) tohumun maksimum üreaz aktivitesi 40 ° C sıcaklıkta elde edilmiş ve bu sıcaklık derecesi değerinden sonra enzim hızla denatüre olmuş ve böylece aktivitesini kaybetmiştir. Enzim moleküllerin kinetik enerjisi, sıcaklıktaki artışla artar ve bu da reaksiyon hızının artmasına neden olur. Sıcaklık daha da arttırıldığında, enzim molekülleri enerji bariyerini aşar. Dolayısıyla enzimin 3 boyutlu yapısını korumaktan sorumlu olan hidrojen ve hidrofobik bağların kırılmasına neden olur ve bundan sebep aktivitede düşüş meydana gelir (El-Hefnawy *et al.* 2014).

Son olarak Şekil 20e incelendiğinde, inkübasyon zamanı, 1.seviyesinde S/N değerleri maksimum olup diğer parametrelerin grafiğine göre S/N ortalamasından (14,073) oldukça yüksek bir etkisi olduğu görülmüş ve optimum inkübasyon zamanı 5 dk olarak elde edilmiştir. Ancak 5. dakikadan sonra üreaz aktivitesi hızla azalarak ortalamanın altına düşmüştür.



Şekil 20. Enzim konsantrasyonu, karıştırma süresi, santrifüj süresi, sıcaklık ve inkübasyon zamanı parametrelerinin üreaz enzim aktivitesi üzerine etkileri

Enzim, karıştırma süresi, santrifüj süresi, sıcaklık ve inkübasyon süresi parametrelerinin üreaz aktivitesi üzerine etkilerini belirlemek için varyans analizi yapılmış ve varyans analiz sonuçları Tablo 14’te verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarında parametrelerin P değerleri incelenir ve herhangi bir parametrenin P değeri 0,05’ten küçük ise parametrenin deney üzerinde

etkili olduğu anlamına gelmektedir. Diğer taraftan parametreler için hesaplanan P değerinin 0,05'ten büyük olması durumunda, incelenen deneyi üzerinde etkili olmadığı veya az etkisi olduğu söylenebilir .

Tablo 14. Parametrelerin Üreaz Aktivitesi İçin Varyans Analiz Sonuçları

Deney Parametreleri	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Varyans Değeri	F- Değeri	P- değeri	Etki oranı (%) (Contribution)
Enzim	4	546,7	136,68	2,13	0,24	11,74
Karıştırma	4	408,2	102,05	1,59	0,331	8,77
Santrifüj	4	164,9	41,22	0,64	0,66	3,54
Sıcaklık (°C)	4	212,7	53,18	0,83	0,569	4,57
İnkübasyon Zamanı	4	3066,5	766,62	11,97	0,017	65,87
Hata	4	256,1	64,03			5,50
Toplam	24	4655,1				100,00

Tablo 14'te görüldüğü gibi, inkübasyon zamanına karşılık gelen P değeri 0,017'dir. Bu değer 0,05'ten küçük olduğundan üreaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde en etkili parametre inkübasyon zamanı olduğu söylenebilir. Enzim konsantrasyonu, karıştırma süresi, santrifüj süresi ve sıcaklık derecesi parametrelerine karşılık gelen P değerleri 0.05'ten büyüktür. Bu durumda bu dört parametrenin üreaz aktivitesine etkisinin çok az olduğu söylenebilir.

Tablo 14'te F değerleri ve etki oranı (%), parametrelerin üreaz enzim aktivitesine sırasıyla etki dereceleri ve etki yüzdelerini göstermektedir. F değerleri ve etki oranlarına bakıldığında, en yüksek etki derecesi (11,97) ve en yüksek etki oranına (% 65,87) sahip parametrenin inkübasyon zamanı olduğu ve bu parametrenin aktivite belirlenmesinde en etkili parametre olduğu anlaşılmaktadır. Sonuç olarak üreaz enzim aktivitesine en etkili parametreler sırasıyla inkübasyon zamanı (etki oranı: %65,87), enzim miktarı (%11,74), karıştırma süresi (%8,77), sıcaklık derecesi (%4,57) ve santrifüj süresi (%3,54) olarak sıralanabilir.

Elde edilen sonuçların doğru olup olmadığını anlamak için optimum parametrelere göre bir doğrulama deneyi yapılması gerekmektedir. Doğrulama deneyinden edilen sonucun güven aralığının arasında olmalıdır. Genellikle Tablo 15'te bulunan hatanın varyans değeri kullanılarak güven aralığı hesaplanır ancak Tablo 15'te de görüldüğü gibi sıcaklık derecesi ve santrifüj süresi parametrelerin üreaz aktivitesi üzerine etkileri az olduğundan daha doğru bir güven aralığı elde etmek için bu iki parametre göz ardı edilmiştir. Etkisi az olan parametrelerin etkileri göz ardı edilmesi veya yokmuş gibi düşünülüp varyans tablosundan çıkarılması ve varyans analizinin yeniden yapılmasına havuzlama (pooling) denir (Ryan 1988). Bu nedenle belirtilen iki parametre göz ardı (pooling) edilerek varyans analizi tekrar yapılmış ve sonuçları Tablo 15'te verilmiştir. Havuzlama yapılan analiz sonuçlardan elde edilen hatanın varyans değeri

kullanılarak üreaz aktivitesinin performans tahmini için güven aralığı hesaplanmış ve sonuçları Tablo 16’da verilmiştir.

Tablo 15. Parametrelerin Üreaz Enzim Aktivitesi İçin Havuzlama (pooling) Sonrası Varyans Analiz Sonuçları

Deney Parametreleri	Havuzlama (Pooling)	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Varyans Değeri	P-Değeri	Etki oranı (%) (Contribution)
Enzim	Hayır	4	546,7	136,68	0,090	11,74
Karıştırma	Hayır	4	408,2	102,05	1,93	8,77
Santrifüj	(Evet)	(4)	-	-	-	-
Sıcaklık (°C)	(Evet)	(4)	-	-	-	-
İnkübasyon Zamanı	Hayır	4	3066,5	766,62	0,0002	65,87
Hata		12	633,7	52,81		13,61
Toplam		24	4655,1			100,00

Deney sonuçlarına göre en yüksek üreaz aktivitesini veren parametre seviyeleri A5, B5, C1, D2 ve E1 olarak bulunmuştur. Burada A5, enzim oranının 5.seviyesini (100 g/L), B5 karıştırma süresinin 5.seviyesini (60 dk), C1 santrifüj süresinin 1. seviyesini (5 dk), D2 sıcaklık derecesinin 2. seviyesini (30 °C) ve E1 inkübasyon zamanının 1. seviyesini (5 dk) göstermektedir. En yüksek üreaz aktivitesini veren seviyeler deney programında bulunmamaktadır. Dolayısıyla optimizasyon sonucunda elde edilen parametre seviyelerinin doğruluğunu kontrol etmek için maksimum üreaz aktivitesi değeri veren parametre seviyeleri (A5, B5, C1, D2 ve E1) kullanılarak numune hazırlanmış ve doğrulama deneyi yapılmıştır. Yapılan doğrulama deneyinden üreaz aktivitesi 74,47 U/mL olarak elde edilmiştir. Yapılan doğrulama deney sonuçlarına göre hesaplanan performans istatistiği (S/N) ise 37,44’dır. Performans istatistiği (SN) %95 güven seviyesinde 23,85 ile 45,49 arasında olmalıdır. Dolayısıyla, %95 güven aralığında söz konusu değerin doğru olduğu söylenebilir.

Tablo 16. Üreaz Aktivitesinin Performans Tahmin Değerleri

Faktör	Seviye	S/N Performans İstatistiğine Olan Katkısı
Enzim	A5	4,31
Karıştırma	B5	1,934
Santrifüj	C1	-
Sıcaklık	D2	-
İnkübasyon Zamanı	E1	14,356
Tüm Faktörlerin Katkısı (S/N)		23,97
Ortalama Performans İstatistiği (S/N)		14,073
Optimum Şartlarda Beklenen Değer (S/N)		34,673
Doğrulama Deneyi Sonucu (S/N) / (U/mL)		37,44/74,47
Güven Aralığı ($\alpha=95\%$) (S/N)		23,85-45,49

Kalsiyum Karbonat Çökelme (Tüp) Deneyi Sonuçları

Zemin iyileştirilmesinde kullanacağımız optimum EICP uygulama çözeltisi bileşenlerini (üre, CaCl_2 ve üreaz) elde etmek için Taguchi optimizasyon metodu kullanılarak kalsiyum karbonat çökelme deneyi yapılmıştır. Çökelme deneylerinde en yüksek üreaz aktivitesini veren karıştırma süresi, santrifüj süresi ve sıcaklık seviyeleri kullanılarak hazırlanmıştır. Deneyler sonucunda oluşan kalsiyum karbonat ağırlıkları kullanılarak çökelme oranları (PR (%)) hesaplanmış ve sonuçları Tablo17’de verilmiştir. Çökelme oranları için parametrelerin ortalama S/N etki oranları ise Tablo 18’ de verilmiştir.

Tablo 17. Kalsiyum Karbonat Çökelme Deney Sonuçları ve Performans istatistiği (S/N) Oranları

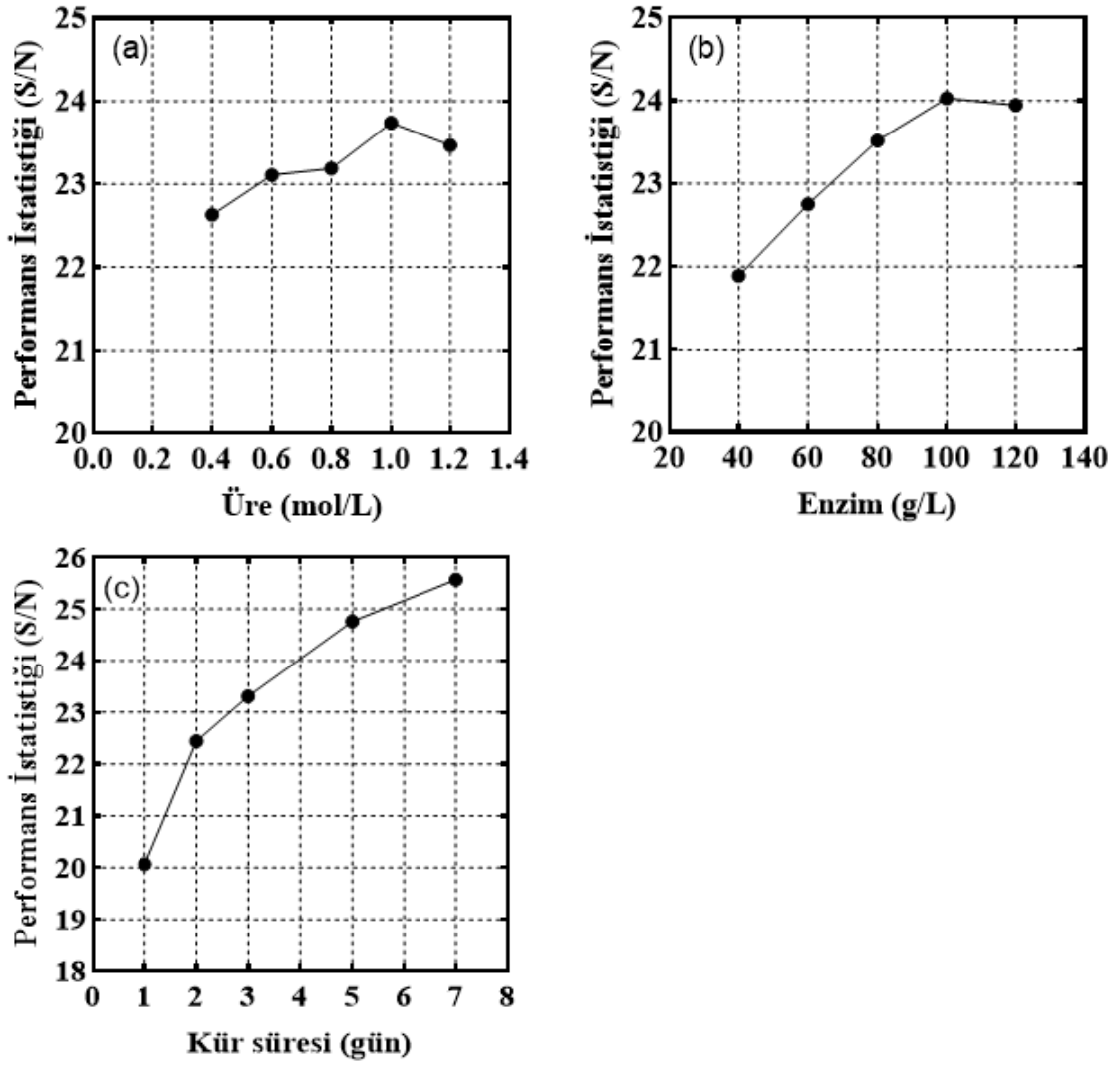
Deney No	Çökelme Oranı PR (%)	Performans İstatistiği (S/N)
1	7,604	17,617
2	10,942	20,782
3	15,563	23,840
4	18,748	25,459
5	18,831	25,493
6	13,016	22,264
7	13,065	22,320
8	17,388	24,794
9	18,824	25,492
10	10,935	20,774
11	11,691	21,342
12	16,486	24,333
13	19,434	25,771
14	11,768	21,412
15	14,591	23,276
16	15,271	23,678
17	20,718	26,320
18	10,734	20,611
19	14,800	23,404
20	17,117	24,662
21	17,256	24,738
22	9,977	19,949
23	13,474	22,590
24	16,659	24,432
25	18,872	25,516
ORTALAMA		23,235

Tablo 17’de verilen S/N değerleri ve Tablo 18’de verilen parametrelerin ortalama S/N etki oranları çökelme oranları kullanılarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada, zemin iyileştirilmesinde kalsiyum karbonat çökelme oranının en büyük olması istendiğinden analiz sırasında en büyük en iyi performans istatistiği kullanılmıştır. Tablo 18’de her bir parametrenin en yüksek S/N değeri, o parametre için optimum seviyeyi vermektedir. Hesaplanan en yüksek S/N değerleri; üre 4. Seviyesinde (23,74), enzim 4. seviyesinde (24,04) ve kür süresi 5. seviyesinde (25,54) elde edilmiştir.

Tablo 18. Kalsiyum Karbonat Çökelme Oranı İçin Parametrelerin Ortalama S/N Etki Oranları

Ortalama S/N Etkileri			
	Üre	Enzim	Kür Süresi
1. Seviye	22,63	21,89	20,07
2. Seviye	23,11	22,75	22,44
3. Seviye	23,19	23,52	23,31
4. Seviye	23,74	24,03	24,76
5. Seviye	23,47	23,95	25,57

Tablo 18’de verilen parametrelerin çökelme oranı üzerindeki etkileri grafik olarak Şekil 21’de gösterilmiştir. Şekil 21a incelendiğinde, maksimum kalsiyum karbonat çökelme oranı, üre 4. seviyesi olan 1 mol/L konsantrasyonunda elde edilmiştir. Yapılan deney sonuçlara göre üre konsantrasyonun 1 mol/L’ye kadar kalsiyum karbonat çökelmesinin arttığı daha sonra azaldığı görölmektedir. Bu azalmanın, üre konsantrasyonu 1 mol/L’den sonra çözeltide ürenin parçalanabilmesi için yeterli miktarda üreaz enzimi bulunmamasından kaynaklandığı düşünölmüştür.



Şekil 21. Üre, enzim konsantrasyonu ve kür süresinin kalsiyum karbonat çökelme oranları üzerine etkileri

Şekil 21b incelendiğinde, enzim konsantrasyonu 100 g/L'e kadar arttıkça kalsiyum karbonat çökelme oranlarında da artış meydana gelmiştir. Enzimin 4. seviyesi olan 100 g/L 'de kalsiyum karbonat çökelme oranı maksimum değere ulaşmıştır. Ancak enzimin 120 g/L konsantrasyonunda kalsiyum karbonat çökelme oranında azalma meydana gelmiştir.

Yapılan çalışmada kalsiyum karbonat çökmesini etkileyen en etkili parametrenin kür süresi olduğu görülmüştür. Şekil 21c'ye bakıldığında kür süresi arttıkça S/N değerlerinde de artış meydana gelmiş ve böylece çökelme oranlarına olumlu yönde katkı sağladığı görülmüştür. Maksimum kalsiyum karbonat çökelme oranı kür süresinin 5. seviyesi olan 7. günde elde edilmiştir.

Parametrelerin çökelme oranları üzerine etkilerini belirlemek için varyans analizi yapılmış ve varyans analiz sonuçları Tablo 19'da verilmiştir. Tablo 19 incelendiğinde kür süresine karşılık gelen P (3×10^{-7}) değeri enzim ve kür süresinin P değerlerinden ve 0,05

değerinden küçüktür. Kalsiyum karbonat çökelme oranı üzerinde en etkili parametrenin kür süresi olduğu görülmektedir. P değeri 0,003 olan enzim kür süresinden sonra en etkili parametredir. Öte yandan P değeri 0,364 olan üre deneyde en az etkili parametre olduğu görülmektedir. Kür süresi, enzim ve ürenin çökelme oranı üzerinde etki oranları sırasıyla % 80,51, % 12,40, ve % 2,02 olarak belirlenmiştir.

Tablo 19. Parametrelerin Çökelme Oranları İçin Varyans Analiz Sonuçları

Deney Parametreleri	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Varyans Değeri	F- Değeri	P- değeri	Etki oranı (%) (Contributi on)
Üre	4	5,93	1,48	1,19	0,364	2,02
Enzim	4	36,45	9,11	7,33	0,003	12,40
Kür Süresi	4	236,69	59,17	47,58	3×10^{-7}	80,51
Hata	12	14,93	1,24			5,08
Toplam	24	293,99				100

Sonuçlar doğruluğunu kontrol etmek için belirlenen tahmini kombinasyonuna (A4, B4 ve C5) göre kalsiyum karbonat çökelme deneyi bir kez daha yapıp %5 hata seviyesinde güven aralığı içine girip girmediği kontrol edilmiştir. Çökelme oranların performans tahmin değerleri Tablo 20’de verilmiştir. Yapılan doğrulama deneyinden kalsiyum karbonat çökelme oranı %25,85 olarak belirlenmiştir. %25,85 çökelme oranına karşılık gelen S/N değeri 28,249’dır. Doğrulama deneyi sonucu hesaplanan S/N değeri %95 güven seviyesinde 25,212 – 28,527 hesaplanan güven aralığının içerisinde kalmıştır.

Tablo 20. Çökelme Oranların Performans Tahmin Değerleri

Faktör	Seviye	S/N Performans İstatistiğine Olan Katkısı
Üre	A4	0,505
Enzim	B4	0,795
Kür Süresi	C5	2,335
Tüm Faktörlerin Katkısı (S/N)		3,636
Ortalama Performans İstatistiği (S/N)		23,235
Optimum Şartlarda Beklenen Değer (S/N)		26,870
Doğrulama Deneyi Sonucu (S/N) / (%)		28,249/25,852
Güven Aralığı ($\alpha=95\%$) (S/N)		25,212-28,527

Literatürde EICP yönteminde optimum uygulama çözeltisini elde etmek ticari üreaz enzim kullanılarak bazı çalışmalar yapılmış ve EICP kimyasal bileşenleri (üre, CaCl_2 ve üreaz) için farklı optimum konsantrasyonları bildirilmiştir. Neupane *et al.* (2013), kalsiyum karbonat deney sonucunda, 0.5 mol/L üre- CaCl_2 konsantrasyonunun, 1.0 mol /L konsantrasyonuna kıyasla daha yüksek CaCO_3 çökeltme oranları (PR) indüklediğini bildirmiştir. Putra *et al.* (2015), 0.5 mol / L üre- CaCl_2 eş molar konsantrasyonunda PR'nin üreaz enzimi konsantrasyonu (g/L) ile arttığını ve maksimum değere ulaştığını bildirmiştir. Almajed *et al.* (2018a), 1 mol / L üre ve 0.67 mol /L CaCl_2 ile 3 g /L üreaz enzim konsantrasyondan oluşan çözeltiyi optimum çözelti olarak belirlemiş ve bu çözeltiyi zeminlere uygulayarak numunelerden önemli mukavemet değerleri elde etmişlerdir. Belirtilen çalışmalardan farklı saflaştırılmış üreaz enzim yerine kavun tohumlarından elde edilen üreaz enzim kullanarak yapmış olduğumuz çalışmada ise, 1mol/L üre, 0,6 mol/L CaCl_2 ve 100 g/L üreaz enzimden oluşan çözelti en yüksek kalsiyum karbonat çökeltme oranını verdiği için optimum çözelti olarak belirlenmiştir.

Kalsiyum kaynağı ve MgCl_2 'ün kalsiyum karbonat çökeltmesi üzerindeki etkileri

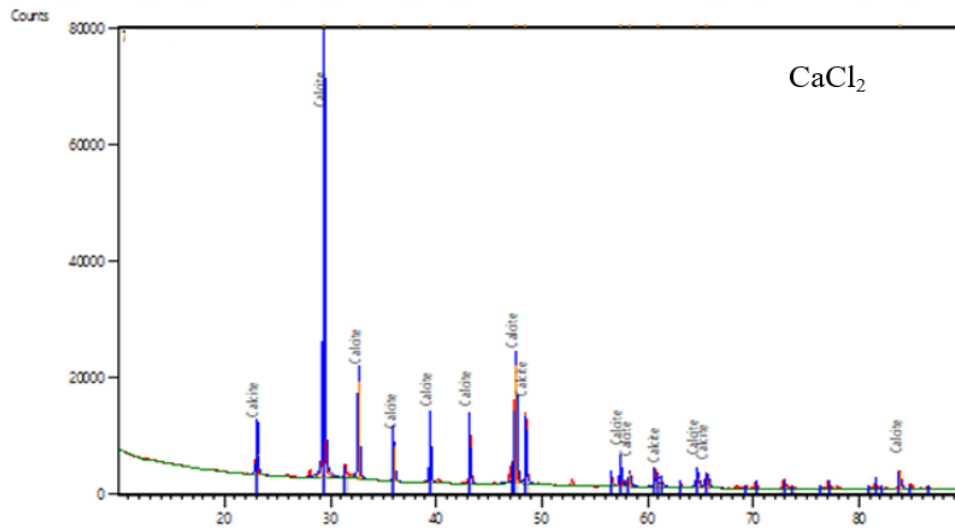
Yapılan optimizasyon sonucunda kalsiyum klorür 0,6 mol/L olarak sabit tutularak en yüksek kalsiyum karbonat çökeltmesi veren çözelti (1 mol/L üre, 0,6 mol/L CaCl_2 ve 100 g/L üreaz enzim oluşan çözelti) elde edilmiştir. 0,6 mol/L kalsiyum klorür (CaCl_2) yerine aynı molaritede kalsiyum asetat ($\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$) ve kalsiyum nitrat ($(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2)$) kullanılarak çökeltme deneyi yapılmıştır. Ayrıca, çözeltideki CaCl_2 'e MgCl_2 katılarak toplam molaritesi 0,6 mol/L olan çözeltiler hazırlanmış ve çökeltme deneyleri yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen çökeltme oranları Tablo 21'de verilmiştir. Deneyler sonucunda çöken malzemelerin kristal yapılarını belirlemek için XRD analizi yapılmış ve sonuçları Şekil 22-24'te gösterilmiştir.

Tablo 21. Farklı Kalsiyum Kaynakları ve Magnezyum Klorür Kullanılarak Yapılan Çökeltme Deneyi Sonuçları

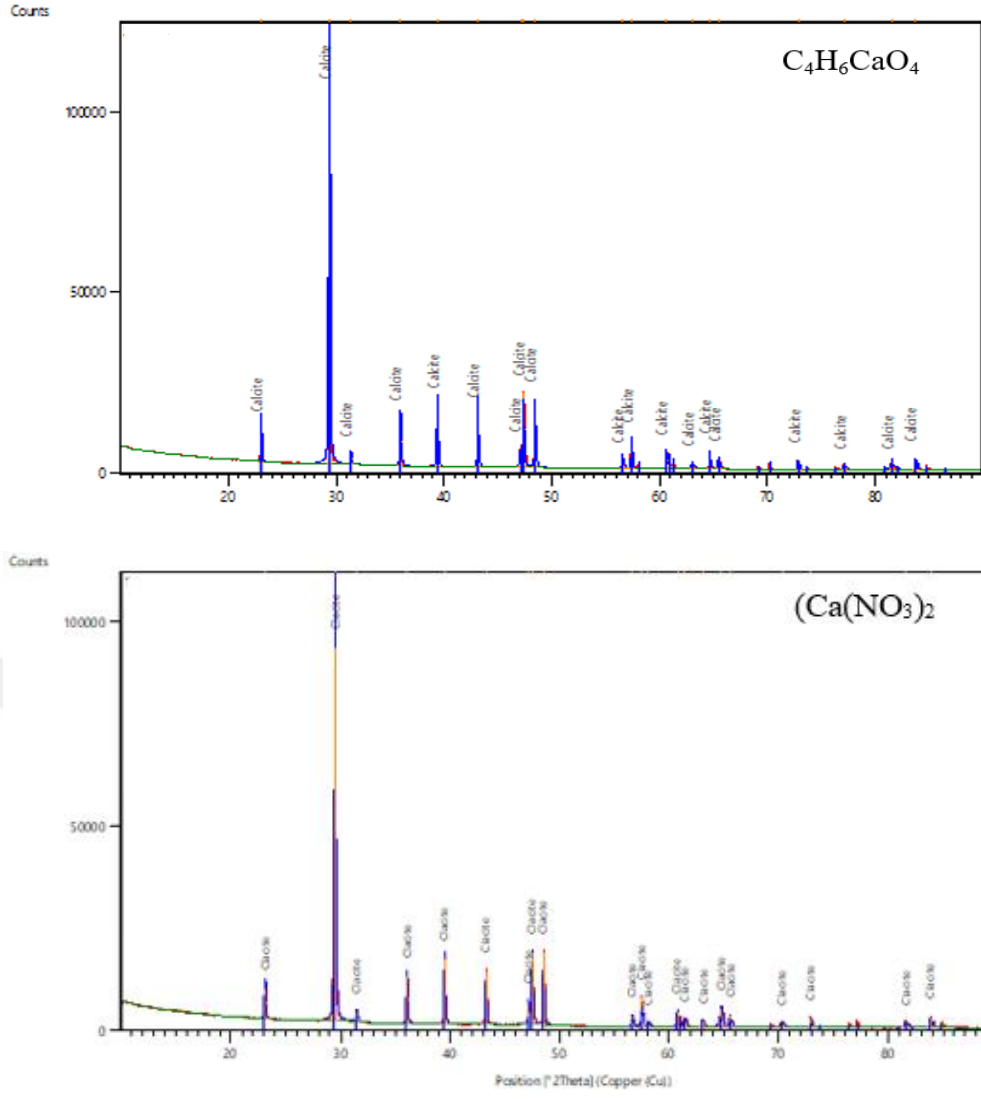
Deney kodu	Kalsiyum kaynakları (mol/L)			Magnezyum klorür (mol/L)	Çökeltme Oranı (%)
	Kalsiyum klorür	Kalsiyum nitrat	Kalsiyum asetat		
T1	0,6	-	-	0,00	22,51
T2		-	0,6	-	20,45
T3		0,6	-	-	25,85
T4	0,525	-	-	0,075	18,56
T5	0,45	-	-	0,15	16,35
T6	0,375		-	0,225	13,78
T7	0,3	-		0,30	14,68

Tablo 21 incelendiğinde, kalsiyum klorür, kalsiyum asetat ve kalsiyum nitrat kullanılan çözeltilerin çökeltme oranları sırasıyla %25,85, %20,45 ve %22,51 olarak elde edilmiştir. En yüksek çökeltme oranı kalsiyum klorür kullanılan çözeltide ve en düşük çökeltme oranı ise kalsiyum asetat kullanılan çözeltide çıkmıştır. Kalsiyum klorür kullanılan çözeltideki çökeltme oranı, kalsiyum nitrat ve kalsiyum asetat kullanılan çözeltideki çökeltme oranlarından yaklaşık %15 ve %26 daha yüksek çıkmıştır. Farklı kalsiyum kaynaklarının XRD analiz sonuçları Şekil 22’de verilmiştir. XRD analizi sonucunda, üç kalsiyum kaynağı kullanılarak hazırlanan çözeltilerde oluşan yapıların kalsit olduğu belirlenmiştir. Çökeltme deneyi ve XRD analiz sonuçlarından hareketle, kullanılan üç farklı kalsiyum kaynağında da üreaz vasıtasıyla hidrolize edilen ürenin kalsiyum iyonlarıyla birleşerek kalsit oluşturduğu tespit edilmiştir.

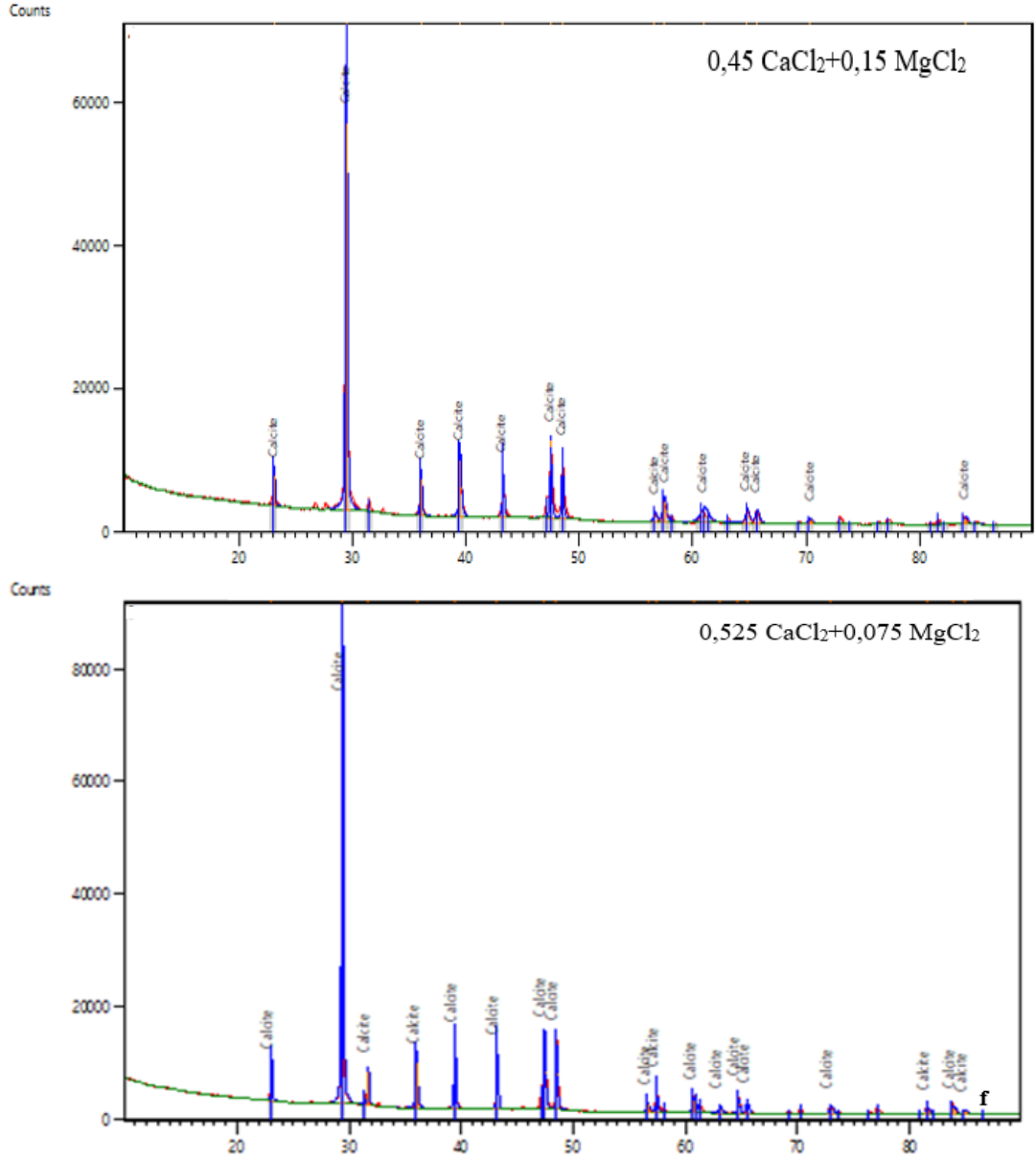
Kalsiyum klorüre önceden belirlenen molaritede magnezyum klorür katılarak elde edilen çözeltilerin çökeltme oranları incelendiğinde, $MgCl_2$ ’ün konsantrasyonu arttıkça çözeltilerin çökeltme oranları azalmıştır. En düşük çökeltme oranı 0,3 M $CaCl_2$ + 0,3 M $MgCl_2$ kullanılarak hazırlanan çözeltiden % 13,78 olarak belirlenmiştir. Maksimum çökeltme oranı veren kalsiyum klorür çözeltisindeki çökeltme oranı, minimum çökeltme oranı veren 0,3 M $CaCl_2$ + 0,3 M $MgCl_2$ çözeltisinden % 86 daha fazla çıkmıştır. Magnezyum katkılı çözeltilerdeki çöken malzemelerin XRD analiz sonuçları Şekil 23 ve Şekil 24’te verilmiştir. XRD analiz sonuçları incelendiğinde oluşan yapıların kalsit olduğu görülmüştür.



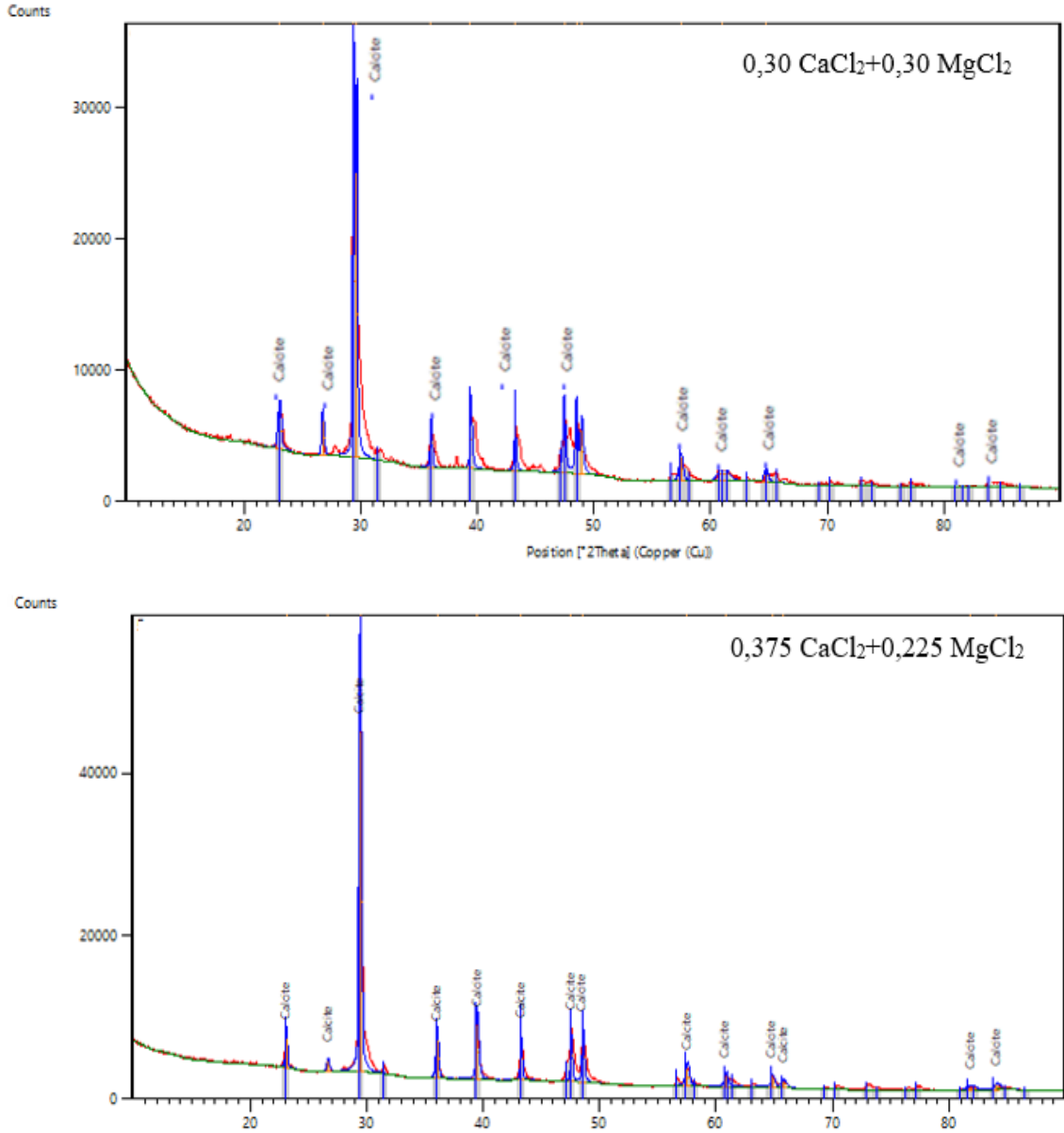
Şekil 22. Farklı kalsiyum kaynakları kullanılarak yapılan çökeltme deneyleri sonucunda oluşan yapılara ait XRD analiz sonuçları (devamı)



Şekil 22. Farklı kalsiyum kaynakları kullanılarak yapılan çökelme deneyleri sonucunda oluşan yapılara ait XRD analiz sonuçları



Şekil 23. Magnezyum katkılı çözeltilerin ($0,575 \text{ CaCl}_2 + 0,075 \text{ MgCl}_2$ ve $0,45 \text{ CaCl}_2 + 0,15 \text{ MgCl}_2$) çökelme deneyleri sonucunda oluşan yapılara ait XRD analiz sonuçları



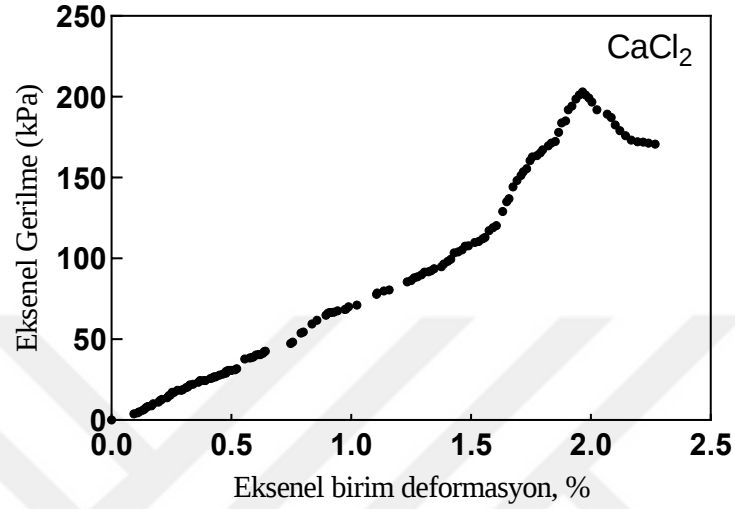
Şekil 24. Magnezyum katkılı çözeltilerin (0,375 CaCl₂+ 0,225 MgCl₂ ve 0,3 CaCl₂+ 0,3MgCl₂) çökeltme deneyleri sonucunda oluşan yapılara ait XRD analiz sonuçları

Serbest Basınç Deneyi Sonuçları

Taguchi tasarım metodu kullanılarak zemine uygulanacak optimum uygulama çözeltisi içeriği tespit edilmiştir. Optimum EICP uygulama çözeltisi yanında, kalsiyum nitrat ve kalsiyum asetat gibi farklı kalsiyum kaynaklardan oluşan çözeltiler ve kalsiyum klorüre farklı molaritede magnezyum klorür katılarak elde edilen uygulama çözeltileri zemine uygulanmıştır. Materyal ve yöntemde belirtildiği gibi uygulama çözeltiler zeminlere üç farklı yöntemle uygulanarak ön deneyler yapılmıştır. Ön deneyler sonucunda, süzülme yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir.

Farklı EICP uygulama çözeltileri kullanılarak iyileştirilen numuneler 7 gün boyunca 60 °C etüvde kurutulmuş ve daha sonra serbest basınç deneylerine tabi tutulmuştur. Optimum

EICP uygulama çözeltisi kullanılarak (1 mol/L üre, 0,6 mol/L CaCl_2 ve 100 g/L) iyileştirilmiş zemin numunesinin eksenel gerilme – eksenel birim deformasyon grafiği Şekil 25'te ve numunelere ait görseller Şekil 26'da verilmiştir. Serbest basınç deneyinden elde edilen sonuçlara göre optimum EICP çözeltisi ile iyileştirilen kum zemin numunelerin serbest basınç mukavemeti ortalama 203 kPa olarak elde edilmiştir.

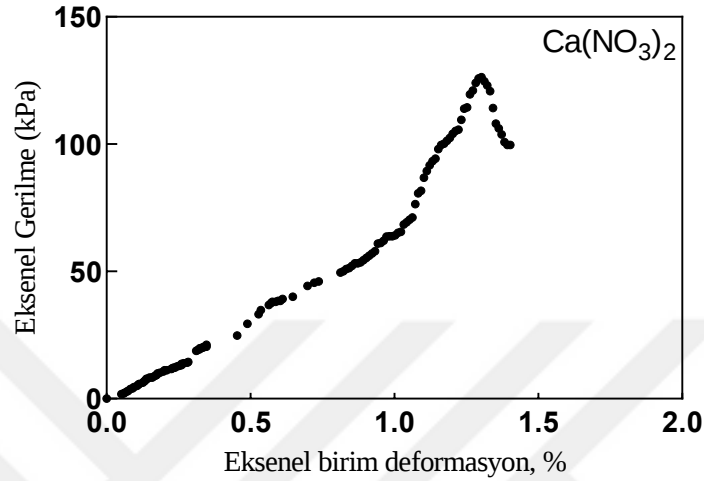


Şekil 25. Optimum EICP uygulama çözeltisi ile iyileştirilen zeminin eksenel gerilme – eksenel birim deformasyon grafiği

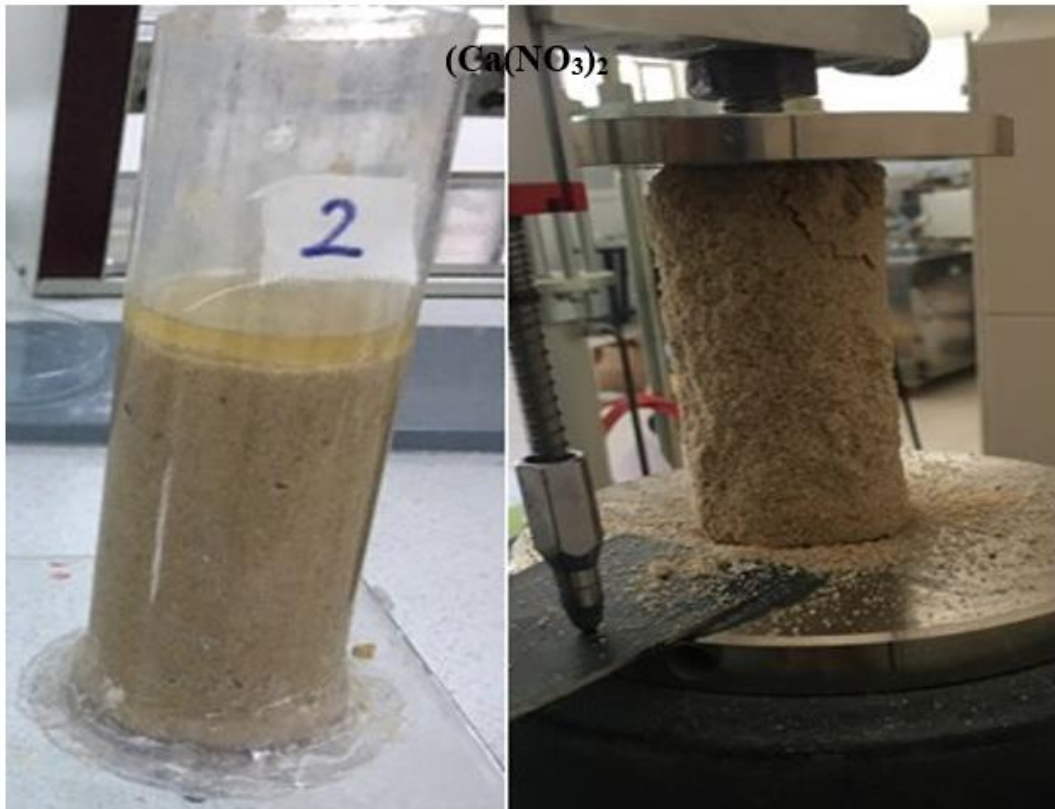


Şekil 26. Kalsiyum klorür içeren EICP çözeltisi uygulanan numune ve serbest basınç deneyine ait görsel

Kalsiyum nitrat içeren EICP çözeltisi uygulanarak iyileştirilen kum zemin üzerinde yapılan serbest basınç deneyi sonucunda elde edilen eksenel gerilme – eksenel birim deformasyon grafiği Şekil 27’de ve bu numunelere ait fotoğraflar Şekil 28’de verilmiştir. Kalsiyum nitrat içeren EICP çözeltisi uygulanarak iyileştirilen zeminin serbest basınç mukavemeti 125 kPa olarak belirlenmiştir.

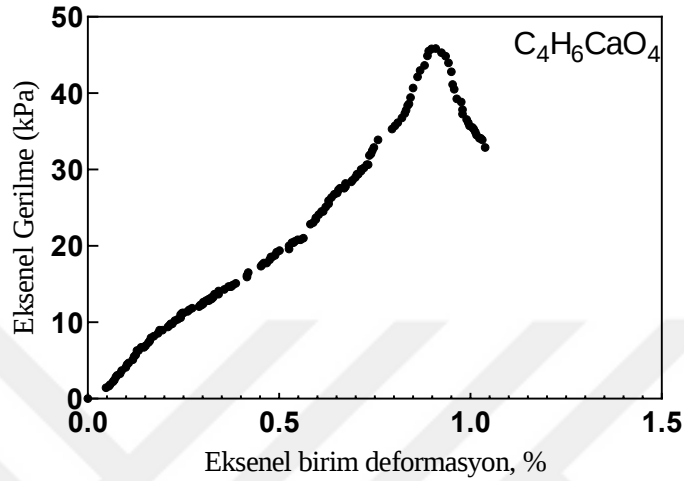


Şekil 27. Kalsiyum nitrat içeren EICP uygulama çözeltisi ile iyileştirilen zeminin eksenel gerilme – eksenel birim deformasyon grafiği



Şekil 28. Kalsiyum nitrat içeren EICP çözeltisi uygulanan numune ve serbest basınç deneyine ait görsel

Kalsiyum asetat içeren EICP çözeltisi uygulanarak iyileştirilen kum zemin üzerinde yapılan serbest basınç deneyi sonucunda elde edilen eksenel gerilme – eksenel birim deformasyon grafiği Şekil 29’da ve bu numunelere ait görseller ise Şekil 30’da verilmiştir. Kalsiyum asetat içeren EICP çözeltisi uygulanarak iyileştirilen kum zeminin serbest basınç mukavemeti 46 kPa olarak elde edilmiştir.



Şekil 29. Kalsiyum asetat içeren EICP uygulama çözeltisi ile iyileştirilen zeminin eksenel gerilme – eksenel birim deformasyon grafiği



Şekil 30. Kalsiyum asetat içeren EICP çözeltisi uygulanan numune ve serbest basınç deneyine ait görsel

Farklı kalsiyum kaynakları içeren EICP çözeltisi uygulanan numunelerden en yüksek serbest basınç mukavemeti (203 kPa) kalsiyum klorür uygulanan numunelerden elde edilmiştir. En düşük serbest basınç mukavemeti EICP çözeltisinde kalsiyum asetat kullanılarak

iyileştirilmiş numunelerden elde edilmiştir. EICP çözeltisinde kalsiyum klorür kullanılarak iyileştirilmiş numunelerin serbest basınç mukavemeti, kalsiyum nitrat ve kalsiyum asetat kullanılarak iyileştirilmiş zeminlerden %62 ve % 351 daha büyük çıkmıştır. Çalışmamız literatüre de yapılan çalışmalara benzer sonuçlar vermiştir. Park *et al.* (2014), kalsiyum klorür, kalsiyum hidroksit ve kalsiyum nitrat dahil olmak üzere üç farklı kalsiyum kaynağını kum zemin iyileştirilmesinde kullanmışlardır. Üreaz, Jack Bean bitkisinden ham ekstrakt olarak elde edilerek kullanılmıştır. Üreaz, üre ve farklı kalsiyum kaynaklarından oluşan çözelti zemin numunelerine uygulanmış ve numunelerin mukavemetleri belirlenmiştir. İyileştirilen numunelerden 30 kPa-317 kPa aralığında serbest basınç mukavemeti elde edilmiştir. Sonuç olarak kalsiyum klorür uygulanan numunenin serbest basınç mukavemetinin, kalsiyum hidroksit ve kalsiyum nitrat uygulanan numunelerden daha yüksek olduğu görülmüştür.

Kalsiyum klorür kullanılmış numunelerin serbest basınç mukavemetinin daha yüksek çıkmasının sebebi, kalsiyum klorürün oda sıcaklığında çözünürlüğünün, kalsiyum asetat veya kalsiyum nitratından daha büyük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kalsiyum asetat ve kalsiyum nitratın düşük çözünürlüğü, uygulama çözeltisi içinde çözünen kalsiyum iyonlarının konsantrasyonunu düşürmüş ve bu da kalsiyum iyonlarının karbonat iyonları ile birleştirilmesiyle oluşan kalsit çökmesini olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır (Park *et al.* 2014).

Magnezyum klorür katkılı EICP çözeltisi (0,375 CaCl₂+ 0,225 MgCl₂) kullanılarak iyileştirilmiş numunelerin görselleri Şekil 31’de gösterilmiştir. MgCl₂ katkılı EICP çözeltileri uygulanan numuneler dağılmış ve mukavemetleri belirlenememiştir. Ancak, Şekilde görüldüğü gibi kum numunelerin bazı bölgelerinde iyileştirmeler oluşmuş ama bu iyileştirme tüm numunede görülebilmiştir.



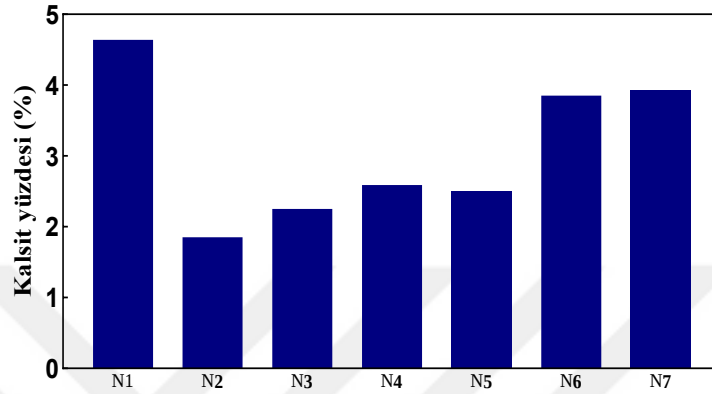
Şekil 31. Magnezyum klorür katkılı EICP çözeltisi uygulanan numunelere ait görseller

Literatürde bulunan çalışmalarda magnezyum klorürün %10 gibi düşük oranlarda kullanıldığı durumunda kalsiyum karbonat çökelme reaksiyon hızını düşürerek kalsitin zemin taneleri içerisinde daha homojen dağılmasını sağladığı ve böylece zeminin serbest basınç mukavemetini olumlu etkilediği görülmüştür (Putra *et al.* 2016; Putra *et al.* 2017a). Chandra and Ravi (2020), killi kum zeminin iyileştirilmesinde EICP'nin verimliliğini artırmak için bir katkı malzemesi olarak magnezyum klorürü kullanmışlardır. Çalışma sonucunda Mg^{+2} iyonlarının düşük oranda (%10) kullanıldığı durumda zeminin kayma mukavemetini önemli ölçüde iyileştirebileceğini bildirilmiştir. Ancak magnezyumun yüksek oranlarda kullanılması durumunda zeminin kayma mukavemeti üzerine olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Belirtilen çalışmalarda kullanılan üreaz saflaştırılmış şekilde ticari olarak temin edilmiştir. Çalışmamızda magnezyum uygulanan numunelerden elde edilen sonuçların literatürdeki çalışmalar ile uyuşmamasının sebebinin üreaz enzim kaynağı veya yüksek oranlarda (%12,5-%50) magnezyum klorürün kullanımından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca çalışmamızda üreaz enzim kaynağı olarak kullandığımız kavun tohumunun ham ekstraktı ticari üreaz enzime göre düşük aktivitesi magnezyum klorürün verimliliğini olumsuz etkilemiş olabileceği söylenebilir.

EICP uygulanmış zeminlerde kalsiyum karbonat içeriği sonuçları

EICP çözeltileri uygulanmış zemin numunelerin üst, orta ve alt bölgelerinden örnekler alınarak kalsiyum karbonat içeriği belirlenmiş ve yüzde cinsinden belirtilmiştir. Böylece uygulama sonrasında zemin matrisi içerisinde oluşan kalsiyum karbonatın içeriği ve dağılımları

tespit edilmiştir. Sadece üre- CaCl_2 çözeltisi uygulanan kontrol numunesinde kalsiyum karbonat içeriği %0,29 olarak belirlenmiştir. Kontrol zemin numunenin çok az miktarda kalsiyum karbonat içeriğine sahip olmasının sebebi zemin cinsinden veya zemin örneklerin yıkanması sırasında zemin taneler arasında kalan kireç vb. farklı maddelerden kaynaklandığı düşünülmüştür (Akoğuz 2019). EICP çözeltileri uygulanan numunelerinin ortalama kalsiyum karbonat içeriği Şekil 32’de verilmiştir.



Şekil 32. EICP uygulama çözeltileri uygulanan numunelerinin ortalama kalsiyum karbonat içeriği

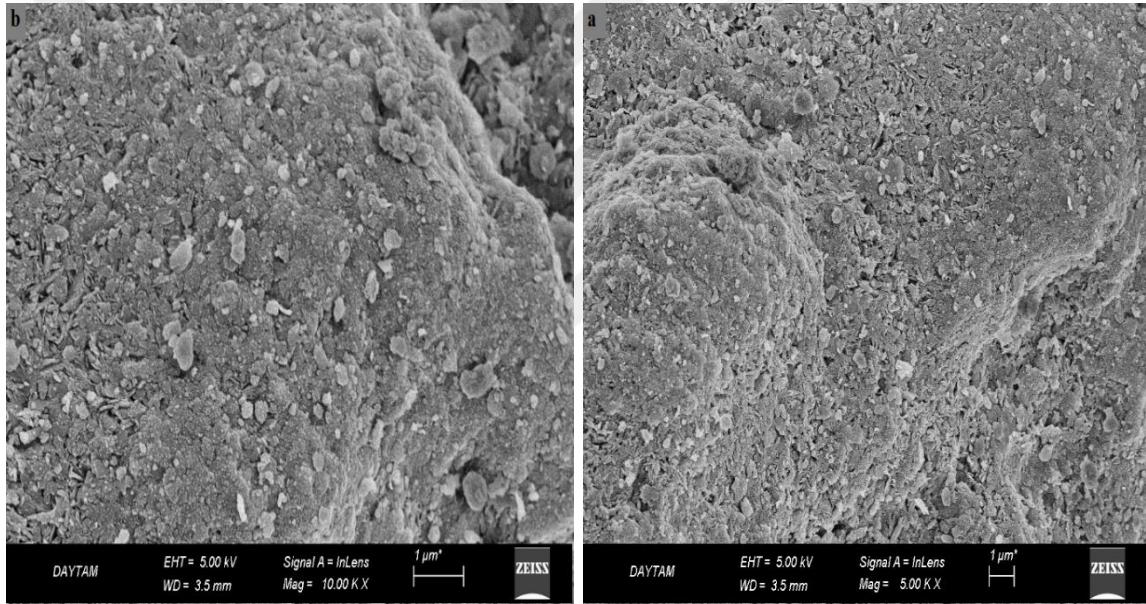
Kalsiyum karbonat içeriği EICP çözeltisinde kalsiyum klorür kullanıldığında %4,64, kalsiyum nitrat kullanıldığında % 3,93 ve kalsiyum asetat kullanıldığında %4,12 olarak belirlenmiştir. Zemin numunelerinde kalsiyum karbonat içeriğinin farklı çıkması farklı kalsiyum kaynaklarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, kum numune içerisindeki akış profili, her bir kum numunedeki yüzey alanları vb. deneysel değişkenlerinde sonucu etkileyen diğer parametreler olduğu bilinmektedir (Choi *et al.* 2017). Magnezyum klorür katkılı EICP çözeltileri (N2, N3, N4 ve N5) uygulanan numunelerde kalsiyum karbonat muhtevası önemli ölçüde düşmüştür. En büyük düşüş 0,3 M magnezyum klorür katkılı numunede %1,85 olarak belirlenmiştir. Çökeltme oranlarında olduğu gibi uygulama çözeltisine MgCl_2 eklenmesi kalsiyum karbonat içeriğini düşürerek kalsiyum çökeltmesini olumsuz etkilemiştir.

Farklı uygulama çözeltileri uygulanan numunelerden elde edilen kalsiyum karbonat içeriği ile serbest basınç mukavemetlerini karşılaştıracak olursak çalışmada en yüksek serbest basınç mukavemeti (203 kPa) en yüksek kalsiyum karbonat içeriği (%4,51) olan numuneden elde edildiği görülmektedir. Whiffin *et al.* (2007) ve Van Paassen *et al.* (2010) zemin numunelerin kalsit içeriğinin artması ile serbest basınç mukavemetinin arttığını bildirmişlerdir. En yüksek kalsiyum karbonat içeriğine (%4,51) yakın kalsiyum karbonat içeriğine sahip kalsiyum asetat ve kalsiyum nitrat uygulanan numunelerden sırasıyla %4,12 kalsiyum karbonat içeriğinde 49 kPa ve %3,93 kalsiyum karbonat içeriğinde 125 kPa serbest basınç mukavemetleri

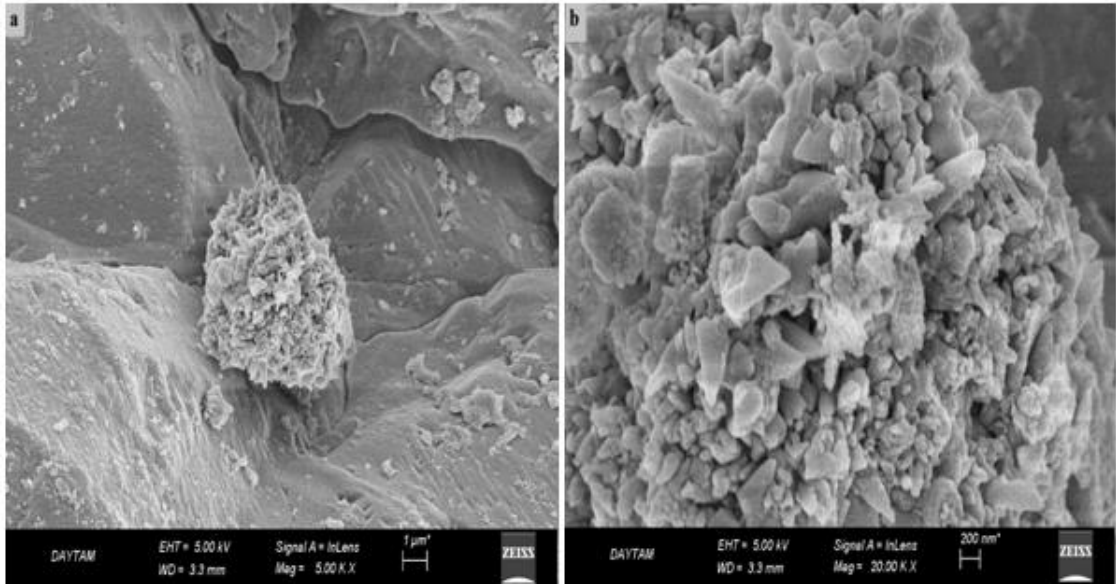
elde edilmiştir. % 3'ün altında kalsiyum karbonat içeriklerine sahip magnezyum içeren çözeltileri uygulanan numunelerden mukavemet alınamamıştır.

SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Analiz Sonuçları

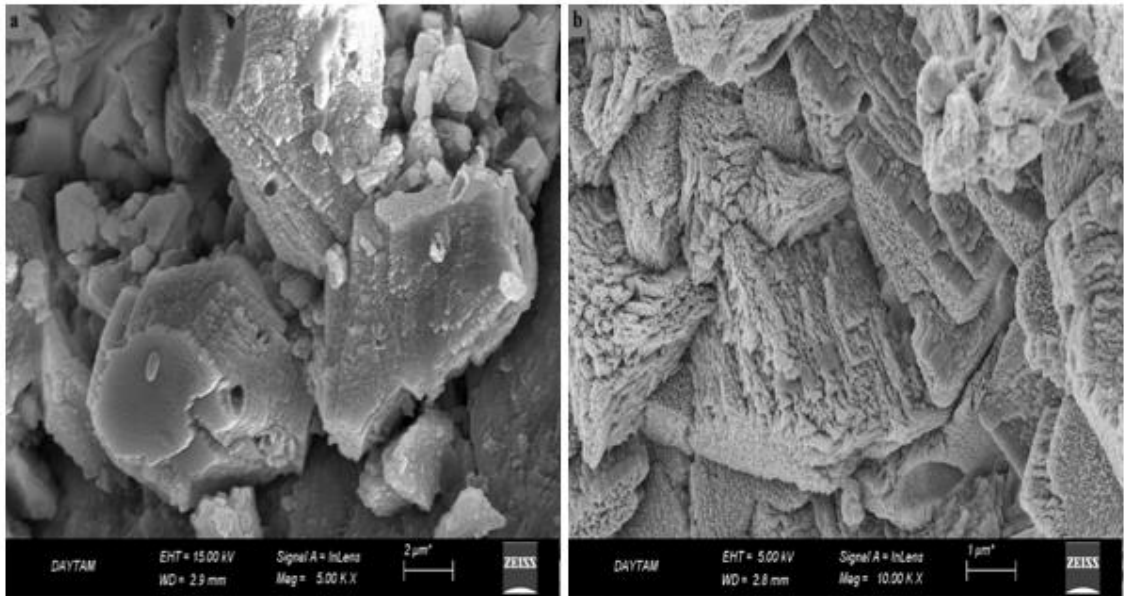
EICP çözeltisinde farklı kalsiyum kaynakları ve magnezyum kullanılarak yapılan kalsiyum karbonat çökelme deneyleri sonucunda oluşan kalsiyum karbonat kristal fazı tüm numunelerde kalsit olduğu XRD analizi ile belirlenmiştir. EICP çözeltisinde farklı kalsiyum kaynakları ve magnezyum klorür kullanılarak iyileştirilmiş zeminlerden SEM görüntüleri alınmış ve Şekil 33-37' de gösterilmiştir. Şekil 33'te uygulama yapılmayan kum zeminin SEM görüntüsü verilmiştir. İyileştirme yapılmamış kum zeminin SEM görüntülerinde kalsiyum karbonat görülmemiştir. Şekil 34, 35, 36 ve 37'de uygulama yapılan numunelerin SEM görüntüleri incelendiğinde, kalsitin zeminlerin yüzeyinde olduğu görülmektedir.



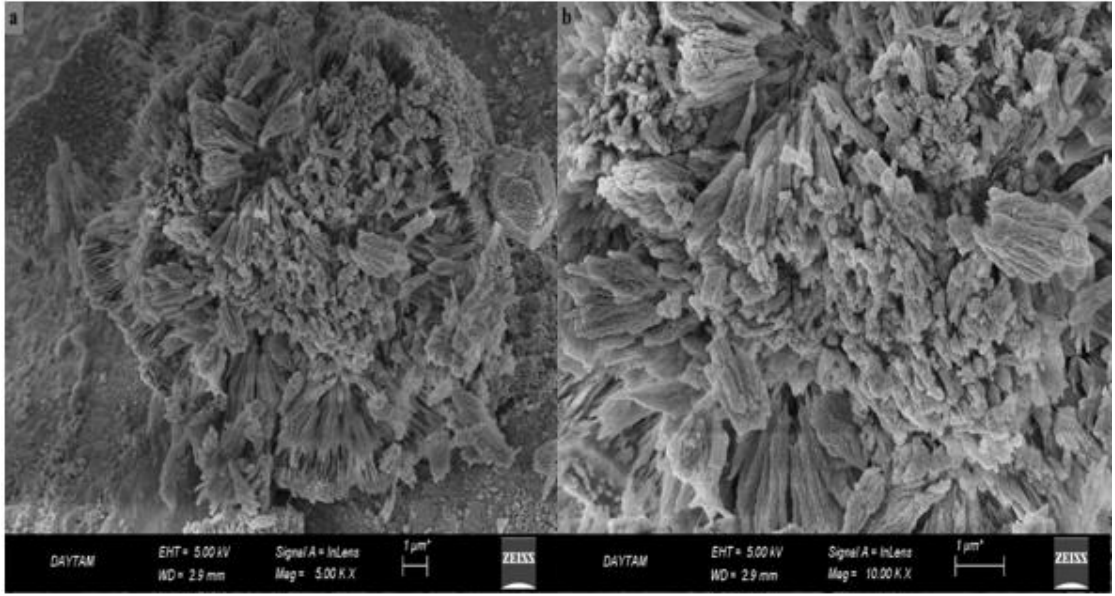
Şekil 33. Uygulama yapılmayan kum zemine ait SEM analiz görseli (a) 5000 x (b) 10000 x yakınlaştırma



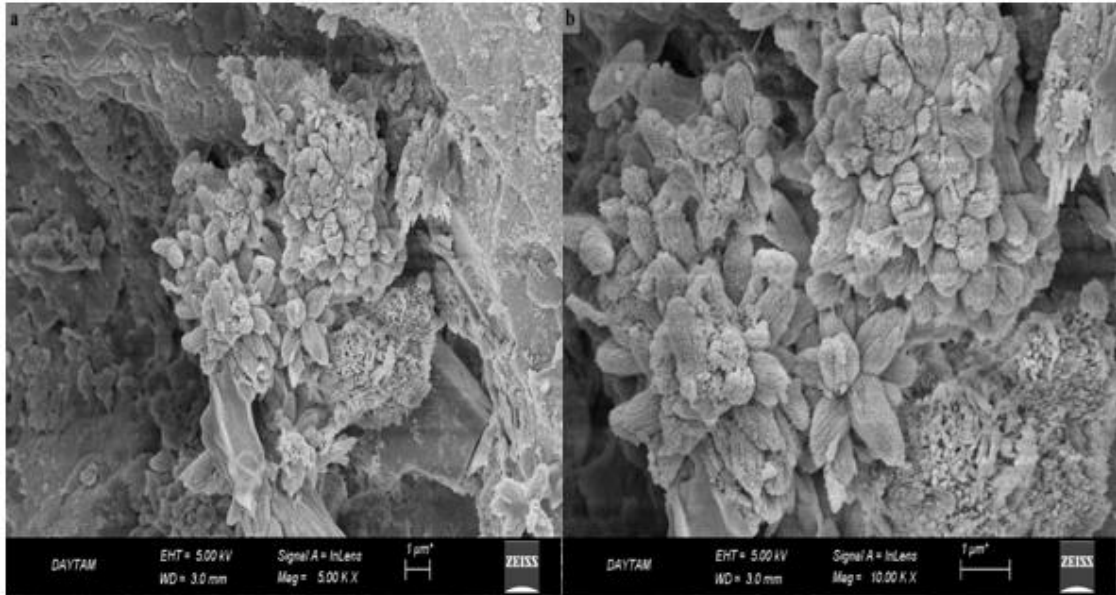
Şekil 34. Kalsiyum klorür içeren optimum EICP çözeltisi uygulanan zemin numunesine ait SEM analiz görseli (a) 5000 x (b) 20000 x yakınlaştırma



Şekil 35. Kalsiyum nitrat içeren EICP çözeltisi uygulanan zemin numunesine ait SEM analiz görseli (a) 5000 x (b) 10000 x yakınlaştırma



Şekil 36. Kalsiyum asetat içeren EICP çözeltisi uygulanan zemin numunesine ait SEM analiz görseli (a) 5000 x (b) 10000 x yakınlaştırma

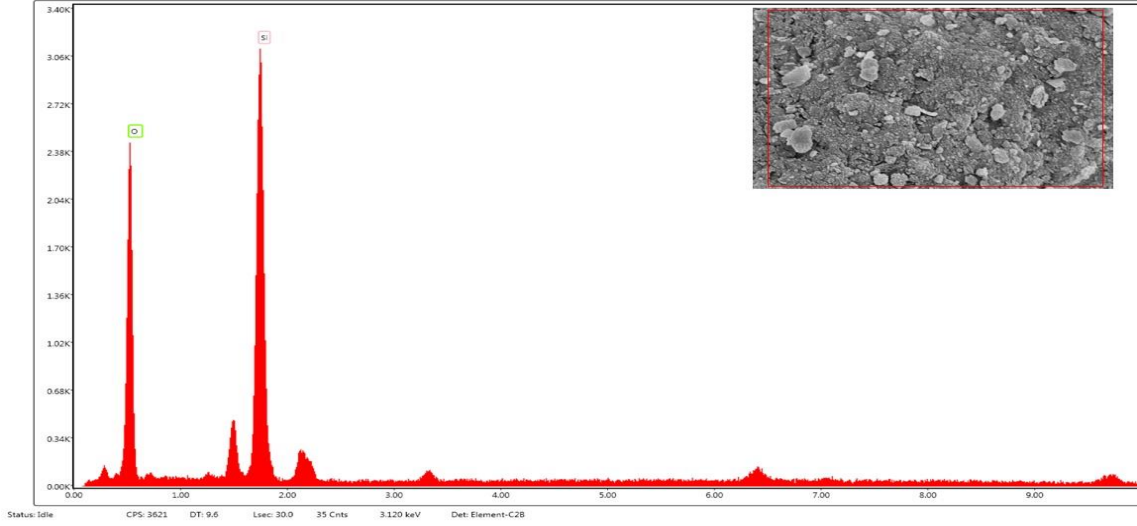


Şekil 37. Magnezyum katkılı EICP çözeltisi (0,375 CaCl₂+ 0,225 MgCl₂) uygulanan zemin numunesine ait SEM analiz görseli (a) 5000 x (b) 10000 x yakınlaştırma

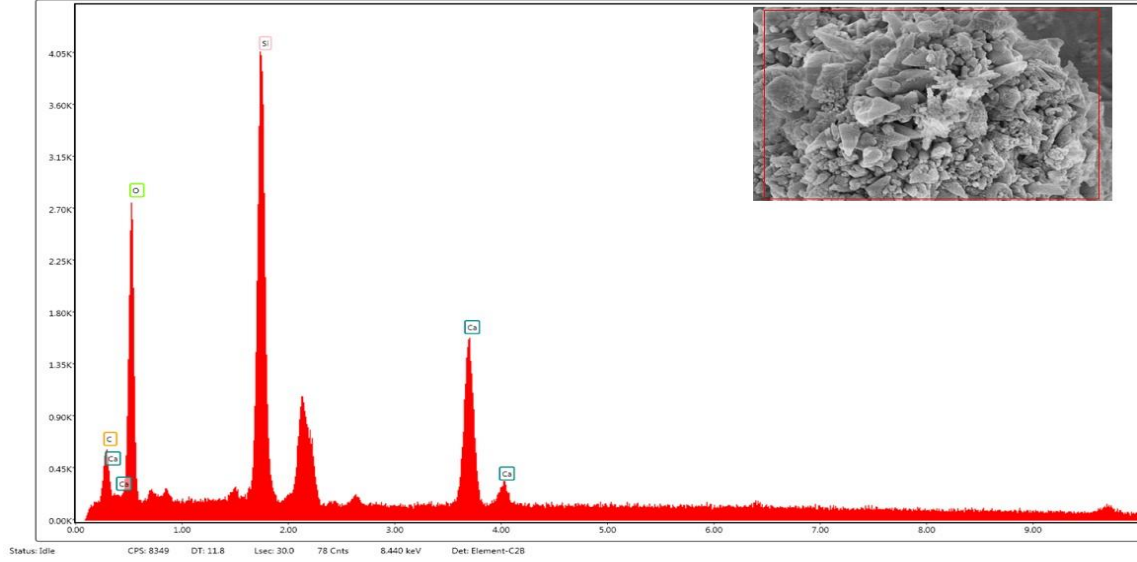
EDX (Enerji Dağılımlı X-Işını Spektrometresi) Analiz Sonuçları

Uygulama yapılan ve yapılmayan zemin numunelerinde mineral dağılımları hakkında bilgi edinmek ve oluşan kalsiyum karbonatın elementlerini (Ca, C, O) doğrulamak için EDX analizi yapılmıştır. EDX analizi sonuçları Şekil 38-42'in sağ üst taraflarında bulunan SEM görüntüsündeki kristal kütleyle odaklanarak yapılmıştır. Şekil 38'de uygulama yapılmayan kum zeminin analizi gösterilmiştir. Analiz sonucu oluşan pikler incelendiğinde beklendiği üzere sadece silis kum yapıtaşının (SiO₂) Si ve O element pikleri görülmektedir.

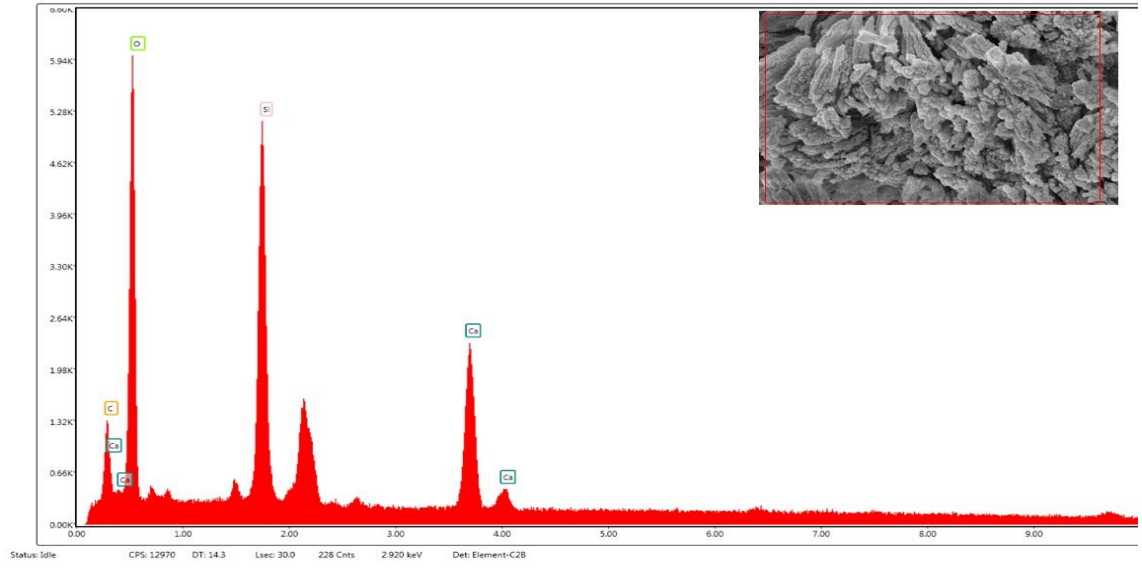
Şekil 39, 40 ve 41’de EICP çözeltisinde farklı kalsiyum kaynakları uygulanarak iyileştirilmiş zemin numunelerinin EDX analiz sonuçlarına bakıldığında, zeminlerde oluşan kalsiyum karbonattan (CaCO_3) dolayı Ca, C, O ve kum zemin yapıtaşından dolayı (SiO_2) Si ve O element pikleri görülmektedir. Şekil 42 incelendiğinde, magnezyum katkılı çözeltisi uygulanan numunelerde yukarıda belirtilen elementler yanı sıra magnezyum klorür (MgCl_2) katkısından dolayı Mg elementi de görülmektedir.



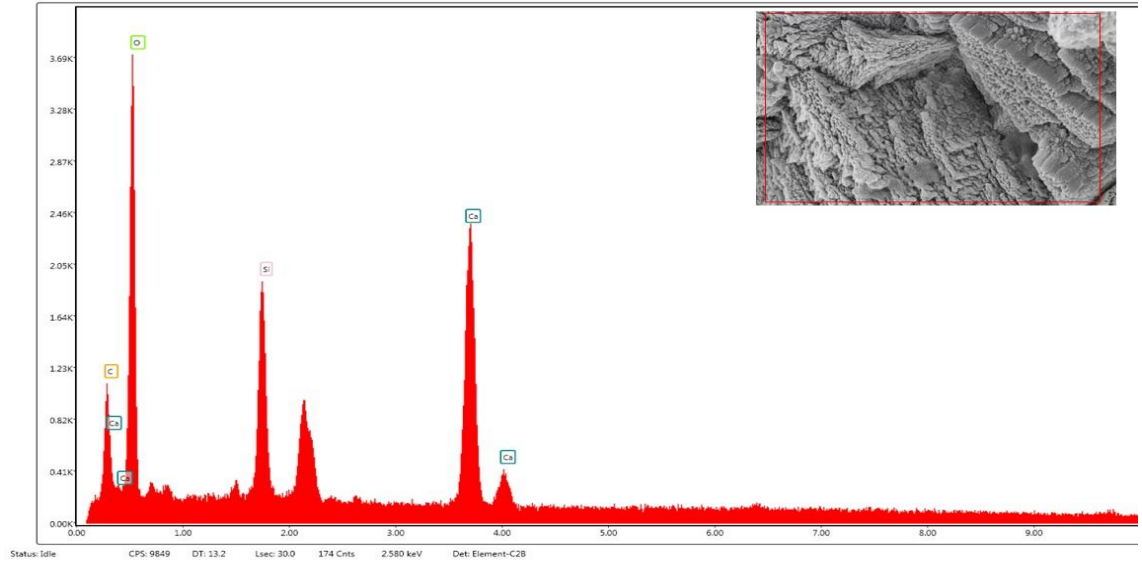
Şekil 38. Uygulama yapılmayan kum zemin numunesine ait EDX analiz sonuçları



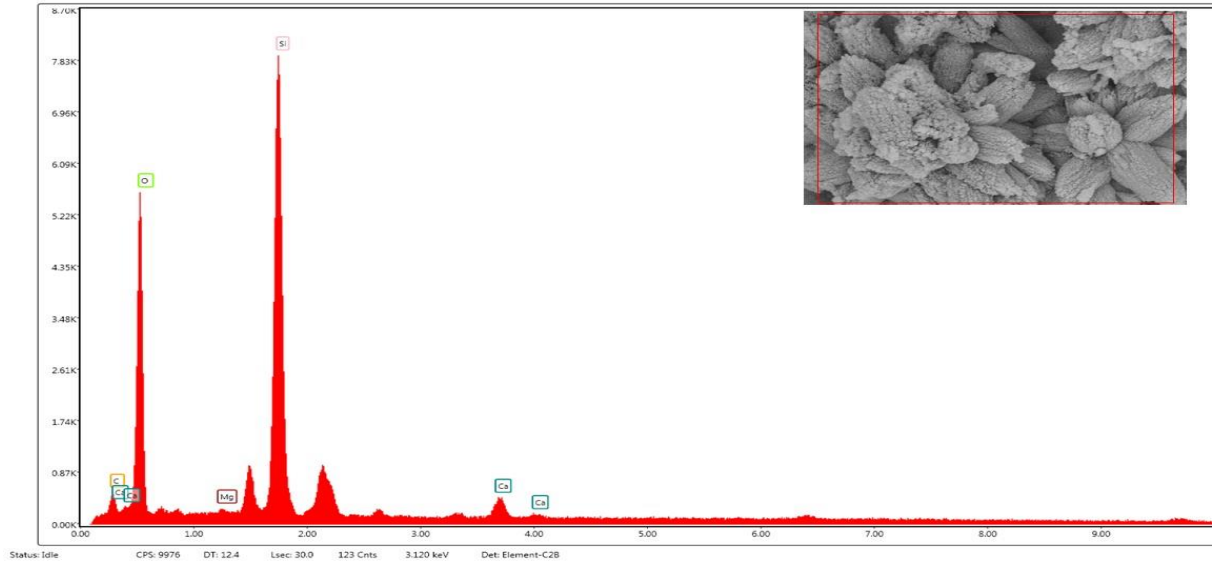
Şekil 39. Kalsiyum klorür içeren (optimum) EICP çözeltisi uygulanan zemin numunesine ait EDX analiz sonuçları



Şekil 40. Kalsiyum asetat içeren EICP çözeltisi uygulanan zemin numunesine ait EDX analiz sonuçları



Şekil 41. Kalsiyum nitrat içeren EICP çözeltisi uygulanan zemin numunesine ait EDX analiz görseli



Şekil 42. Magnezyum klorür katkılı EICP çözeltisi ($0,375 \text{ CaCl}_2 + 0,225 \text{ MgCl}_2$) uygulanan zemin numunesine ait EDX analiz görseli

Genel olarak uygulama yapılan ve yapılmayan numunelerin SEM ve EDX analiz sonuçları değerlendirildiğinde, kavun tohumlarından elde edilen üreazın zeminde kalsit oluşturduğu ve kalsitin zemin boşluklarını doldurup taneleri birbirine bağlayarak zemini iyileştirdiği sonucuna varılmıştır. EICP çözeltisinde katkı olarak magnezyum klorür kullanılmasının mukavemet ve kalsit yüzdesi üzerinde olumlu sonuçlar vermediği belirlenmiştir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, ticari üreaz yerine kavun tohumundan elde edilen üreaz kullanılarak enzim aracılı kalsit çökmesi (EICP) ile kötü derecelenmiş kum bir zeminin (SP) iyileştirilmesi üzerine etki eden parametreler incelenmiştir. Kavun tohumun üreaz aktivitesi ve aktiviteyi etkileyen parametreler Taguchi deney tasarımı uygulanarak Nessler yöntemi ile belirlenmiştir. Zemine uygulanacak optimum EICP çözeltisini elde etmek için Taguchi metodunu kullanılarak kalsiyum karbonat çökme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Farklı kalsiyum kaynakları ve magnezyum klorürün kalsiyum karbonat çökmesi üzerindeki etkileri yapılan kalsiyum karbonat çökme deneyleri ve XRD analizleri ile incelenmiştir. Farklı EICP çözeltileri uygulanan numunelerin serbest basınç mukavemetleri belirlenmiştir. İyileştirme sonucunda zeminlerde oluşan yapıları belirlemek için SEM ve EDX analizleri yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler ışığında ortaya çıkan sonuçlar aşağıda verilmiştir:

Kavun tohumlarının üreaz aktivitesi, aktiviteyi etkileyen parametrelere bağlı olarak 0,352 U/mL ile 59,905 U/mL aralığında belirlenmiştir. Üreaz aktivitesini en etkili parametrelerin sırasıyla inkübasyon zamanı ve enzim konsantrasyonu olduğu görülmüştür. Üreaz aktivitesi enzim konsantrasyonu arttıkça artmış ve inkübasyon zamanı artmasıyla azalmıştır. Üreaz aktivitesi için optimum parametreler, enzim konsantrasyonu 100 g/L, karıştırma süresi 60 dk, santrifüj süresi 5 dk, sıcaklık derecesi 30 °C ve inkübasyon zamanı 5 dk olarak belirlenmiştir.

Taguchi optimizasyon sonucunda kalsiyum karbonat çökmesini etkileyen en önemli parametrenin kür süresi ve ikinci olarak da enzim konsantrasyonu olduğu belirlenmiştir. Enzim konsantrasyonu 100 g/L'e kadar arttıkça kalsiyum karbonat çökme oranları artmış ancak bu değerden sonra çökme oranlarında düşüş görülmüştür. Kür süresi arttıkça çökme oranlarında da artış meydana gelmiştir.

7 günlük kür süresi sonunda en yüksek çökme oranı 1 mol/L üre, 0,60 mol/L kalsiyum klorür ve 100 g/L üreazdan oluşan EICP çözeltisinden %25,85 olarak belirlenmiştir.

En yüksek çökme oranı veren EICP çözeltisindeki kalsiyum klorür yerine aynı molaritede kalsiyum asetat ve kalsiyum nitrat kullanılarak yapılan kalsiyum karbonat çökme deneyi sonucunda sırasıyla %20,45 ve 22,51 çökme oranı elde edilmiştir. Kalsiyum klorür

kullanılan çözeltilerdeki çökeltme oranı, kalsiyum nitrat ve kalsiyum asetat kullanılan çözeltilerdeki çökeltme oranlarından yaklaşık %15 ve %26 daha yüksek çıkmıştır.

En yüksek çökeltme oranı veren EICP çözeltisinde bulunan kalsiyum klorüre katkı olarak magnezyum klorür katılarak yapılan deneyler sonucunda, $MgCl_2$ 'ün konsantrasyonu arttıkça kalsiyum karbonat çökeltme oranları azalmıştır. En yüksek çökeltme oluşan EICP çözeltisinin çökeltme oranı, en düşük çökeltme oluşan magnezyum klorür katkılı EICP çözeltisinden ($0,3\text{ M CaCl}_2 + 0,3\text{ M MgCl}_2$) % 86 daha büyük çıkmıştır.

XRD analiz sonuçlarında farklı kalsiyum kaynakları ve magnezyum klorür katkısı kullanılarak çökeltme deneyler sonucunda oluşan yapıların kalsit olduğu belirlenmiştir.

Farklı kalsiyum kaynakları içeren EICP çözeltisi $Dr=\%50$ rölatif sıklıkta hazırlanmış SP zemine 14 gün uygulanmış ve daha sonra serbest basınç deneyine tabi tutulmuştur. En yüksek serbest basınç mukavemeti 203 kPa olarak kalsiyum klorür içeren (optimum) EICP çözeltisi uygulanan numuneden elde edilmiştir. Kalsiyum klorür uygulanan numunenin mukavemetinin, kalsiyum asetat ve kalsiyum nitrat uygulanan numunelerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Magnezyum uygulanan numunelerden ise mukavemet alınamamıştır.

İyileştirilen zemin numunelerine yapılan SEM ve EDX analiz sonuçlarında zemin taneleri içerisinde oluşan yapıların kalsit ($CaCO_3$) olduğu görülmüştür.

En yüksek kalsiyum karbonat içeriği %4,64 olarak en yüksek serbest basınç değeri veren numuneden elde edilmiş ve bu sonuçtan yola çıkarak numunelerde oluşan kalsit içeriğinin artmasıyla zeminin mukavemetinin arttığı sonucuna varılmıştır.

Kavun tohumlarından elde edilen üreazın zeminde kalsit oluşturduğu ve kalsitin zemin boşluklarını doldurarak taneleri birbirine bağladığı ve iyileştirdiği yapılan serbest basınç deneyi, kalsit yüzdesi deneyi, SEM ve EDX analiz sonuçlarından anlaşılmaktadır.

Zeminlerin EICP yöntemi ile iyileştirme çalışmalarında üreaz maliyetini düşürmek için kavun tohumundan ham ekstrakt olarak elde edilen üreaz ticari ürünün yerine kullanılabilir. Ayrıca, üreaz içeren farklı bitki kaynaklarının farklı zeminlerin iyileştirilmesinde kullanılabilirliğinin araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Akiyama, M., Kawasaki, S., 2011. Fundamental study on new grouting material using calcium phosphate compounds Crystal precipitation test and unconfined compression test of sand test pieces. *Jpn. Geotech. J.*, 6, 341–350.
- Ahenkorah, I., Rahman, M. M., Karim, M. R., & Beecham, S., 2021. Enzyme induced calcium carbonate precipitation and its engineering application: A systematic review and meta-analysis. *Construction and Building Materials*, 308, 125000.
- Akoğuz H., Çelik S., Barış Ö., 2019. The Effects Of Different Sources Of Calcium In Improvoment Of Soils By Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP). *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences Sigma Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 3, 953-965
- Akoğuz, H., 2019. Mikrobiyal Aracılı Kalsit Çökmesi İle Zeminlerin Biyolojik İyileştirilmesinde Bazı Değişkenlerin Etkisinin Araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye.
- Al, N., 2018. Zemin İyileştirme Teknikleri: Bir Uygulama Örneği. Y. Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Almajed, A.A., 2017. Enzyme Induced Carbonate Precipitation (EICP) for Soil Improvement. .D. Thesis, Arizona State University, Phoenix, AZ, USA.
- Almajed, A., Khodadadi Tirkolaie, H., ve Kavazanjian Jr, E., 2018 a. Baseline Investigation on Enzyme-Induced Calcium Carbonate Precipitation. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 144(11), 04018081.
- Almajed, A., Tirkolaie, H.K., Kavazanjian, E., Hamdan, N., 2019. Enzyme Induced Biocementated Sand with High Strength at Low Carbonate Content. *Sci. Rep.*, 9, 1135.
- Almajed, A., Khodadadi, H., and Kavazanjian, E., 2018 b. Sisal fiber reinforcement of EICP-treated soil. in IFCEE 2018, Orlando, FL, March 5–10, 2018, 29–36.
- Almajed, A., Lateef, M. A., Moghal, A. A. B., & Lemboye, K., 2021. State-of-the-art review of the applicability and challenges of microbial-induced calcite precipitation (MICP) and enzyme-induced calcite precipitation (EICP) techniques for geotechnical and geoenvironmental applications. *Crystals*, 11(4), 370.
- ASTM D2487-11., 2011. Standard Practice for Classification of Soils for Engineering Purposes (Unified Soil Classification System). ASTM International, West Conshohocken, PA, 2014.
- ASTM D854-14., 2014. Standard Test Methods for Specific Gravity of Soil Solids by Water Pycnometer. ASTM International, West Conshohocken, PA. Pycnometer, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2014.
- ASTM D2166 / D2166M- 16, Standard Test Method for Unconfined Compressive Strength of Cohesive Soil, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2016.
- Baiq, H. S., Yasuhara, H., Kinoshita, N., Putra, H., & Johan, E., 2020. Examination Of Calcite Precipitation Using Plantderived Urease Enzyme For Soil Improvement. *GEOMATE Journal*, 19(72), 231-237.

- Blakely, R.L., Zerner, B., 1984. Jack Bean Urease: The First Nickel Enzyme. *J. Mol. Catal*, 23, 263–292.
- Burbank, M., Weaver, T., Williams, B., Crawford, R., 2012. Urease Activity of Ureolytic Bacteria Isolated from Six Soils in which Calcite was precipitated by Indigenous Bacteria. *Geomicrobiology*, 29, 389–395.
- Bülbül, Dilara., 2012. *Hypocrea jecorina* SAF KÜLTÜRÜ ve *Trichoderma reesei* 1A MUTANT SUŞUNDAN GLUTAMİNAZ ENZİMİNİN ÜRETİMİ. Y.Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
- Castanier, S., Le Metayer-Levrel, G., and Perthuisot, J. P., 1999. Carbonates precipitation and limestone genesis-the microbiogeologist point of view." *Sedimentary Geology*, Vol. 126, No. 1-4, pp. 9-23.
- Carmona, J. P., Oliveira, P. J. V., & Lemos, L. J., 2016. Biostabilization of a sandy soil using enzymatic calcium carbonate precipitation. *Procedia engineering*, 143, 1301-1308.
- Chandra, A., & Ravi, K., 2020. Effect of magnesium incorporation in Enzyme-Induced Carbonate Precipitation (EICP) to improve shear strength of soil. In *Advances in Computer Methods and Geomechanics* (pp. 333-346). Springer, Singapore.
- Choi, S. G., Chu, J., Brown, R. C., Wang, K., & Wen, Z., 2017. Sustainable biocement production via microbially induced calcium carbonate precipitation: use of limestone and acetic acid derived from pyrolysis of lignocellulosic biomass. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(6), 5183-5190.
- Chu, J., Ivanov, V., Lee, M. F., Oh, X. M., & He, J., 2009. Soil and waste treatment using biocement. In *Proceedings of the international symposium on ground improvement technologies and case histories*, ISGI (Vol. 9, pp. 165-170).
- Chu, J., Ivanov, V., Stabnikov, V., He, J., Li, B., and Naemi, M., 2011. Biocement: Green building and energy saving material. *Advanced Materials Research*, 347–353, 4051–4054.
- Cuccurullo1&2, A., Gallipoli, D., Bruno, A. W., Augarde, C., Hughes, P., & La Borderie, C., 2019. Advances in the enzymatic stabilisation of soils.
- Das, N., Kayastha, AM., Srivastava, PK., 2002. Purification and characterization of urease from dehusked pigeonpea (*Cajanus cajan* L) seeds. *Phytochemistry*, 61: 513-521.
- DeJong, J., Mortensen, B., Martinez, B., and Nelson, D., 2010. "Bio-mediated Soil Improvement". *Ecological Engineering*, 36(2), 197-210.
- DeJong, J., Proto, C., Kuo, M., & Gomez, M., 2014. Bacteria, biofilms, and invertebrates: 152 the next generation of geotechnical engineers?. In *Geo-Congress 2014: Geo-characterization and Modeling for Sustainability* (pp. 3959-3968).
- Demiröz, A., Karaduman, M., 2009. Zemin İyileştirme Metotları. *Selçuk Üniversitesi Selçuk-Teknik Dergisi*, 3(8), 176-192.
- Dilrukshi, R., Kawasaki, S., 2016. Effective use of plant-derived urease in the field of geoenvironmental. *Geotech., Eng., J., Civ., Environ., Eng.*, 6, 2.
- Dilrukshi, R.A.N., Nakashima, K., and Kawasaki, S., 2018. Soil improvement using plant-derived urease-induced calcium carbonate precipitation. *Soils Found*, 58(4), 894-910.
- Dilrukshi, R.A.N., 2017. Low environmental impact type ground improvement methods using biomineral precipitation. Ph.D. Thesis, Hokkaido University, Japan.

- Dominique, J.T., Mark, O.C., Vernon, R.P., 2014. Transport of *Sporosarcina pasteurii* in sandstone and its significance for subsurface engineering technologies. *Appl. Geochem.* 42, 38–44
- El-Hefnawy, M. E., Sakran, M., Ismail, A. I., & Aboelfetoh, E. F., 2014. Extraction, purification, kinetic and thermodynamic properties of urease from germinating *Pisum Sativum* L. seeds. *BMC biochemistry*, 15(1), 1-8.
- Follmer C., Real-Guerra R., Wasserman G., Olivera-Severo D. ve Carlini C., 2004. Jackbean, Soybean and *Bacillus pasteurii* ureases biological effects unrelated to ureolytic activity. *European Journal of Biochemistry*, 271, 1357-1363.
- Fraley S., Oom M., Terrien B., Zalewski J., 2007. Design of Experiments Via Taguchi Methods: Orthogonal Arrays: The Michigan Chemical Process Dynamic and Controls, Open Textbook, USA, 2007.
- Gat, D., Ronen, Z., Tsesarsky, M., 2016. Soil bacteria population dynamics following stimulation for ureolytic microbial-induced CaCO_3 precipitation. *Environ. Sci. Technol.*, 50, 616–624.
- Gomez, M. G., Martinez, B. C., DeJong, J. T., Hunt, C. E., deVlaming, L. A., Major, D. W., and Dworatzek, S. M., 2015. Field-scale bio-cementation tests to improve sands. *Proceedings of the Institution of Civil Engineers - Ground Improvement*, 168(3), 206–216.
- Gupta, S. G., Rathi, C., and Kapur, S., 2013. Biologically Induced Self Healing Concrete: A Futuristic Solution for Crack Repair, *Int. J. Appl. Sci. Biotechnol.*, vol. 1, no. 3, pp. 85–89.
- Hamdan, N. M., 2015. Applications of enzyme induced carbonate precipitation (EICP) for soil improvement. Ph.D. Thesis, Arizona State University, Phoenix, AZ, USA.
- Hamdan, N., Kavazanjian, E., O'Donnell, S., 2013. Carbonate Cementation via Plant Derived Urease. In *Proceedings of the 18th International Conference on Soil Mechanics and Geotechnical Engineering*, Paris, France, . 2489–2492.
- Hariharan, M. Varghese, N., Cherian, A.B., Sreenivasan, P.V., Paul, J., Antony, A.K.A., 2014. Synthesis and characterisation of CaCO_3 (calcite) nano particles from cockle shells using chitosan as precursor. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4(10).
- Henze, J., Randall, D., 2018. Microbial induced calcium carbonate precipitation at elevated pH values (>11) using *Sporosarcina pasteurii*. *J. Environ. Chem. Eng.* 6, 5008–5013.
- Hınıslioğlu, S., & Bayrak, O. Ü., 2004. Optimization of early flexural strength of pavement concrete with silica fume and fly ash by the Taguchi method. *Civil Engineering and Environmental Systems*, 21(2), 79-90.
- Hoang, T. P., 2018. Sand and silty-sand soil stabilization using bacterial enzyme induced carbonate precipitation BEICP. Doctoral dissertation, Iowa State University.
- Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K. ve Isono, M., 1973. Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organism. *Journal of General Microbiology*, 76:85–99.
- Javadi, N., Khodadadi, H., Hamdan, N., ve Kavazanjian Jr, E., 2018. EICP Treatment of Soil by Using Urease Enzyme Extracted from Watermelon Seeds, 144(11), 04018081.
- Javadi, N. (2021). *The Properties and Longevity of Crude Urease Extract for Biocementation*. (Doctoral dissertation, Arizona State University).

- Jacob, D., 1999. *Geochemical Cycles. Introduction to Atmospheric Chemistry*. Princeton University Press
- Kavazanjian, E., & Hamdan, N., 2015 . Enzyme induced carbonate precipitation (EICP) columns for ground improvement. In *IFCEE 2015*, pp. 2252-2261.
- Kavazanjian Jr, E., Almajed, A., & Hamdan, N., 2017. Bio-inspired soil improvement using EICP soil columns and soil nails. In *Grouting 2017* (pp. 13-22).
- Kayastha, A. M., and N. Das., 1999. A simple laboratory experiment for teaching enzyme immobilization with urease and its application in blood urea estimation. *Biochemical Education* 27, no. 2: 114-117.
- Kaltwasser, H., Krämer, J., Conger, W.R., 1972. Control of urease formation in certain aerobic bacteria. *Arch. Microbiol.*, 81, 178–196.
- Keha, E., ve Küfrevioğlu, İ., 2011. *Biyokimya, Sekizinci Baskı, Aktif Yayınevi, İstanbul*.
- Knorr, B., 2014. Enzyme-induced carbonate precipitation for the mitigation of fugitive dust. M., thesis., Arizona State University.
- Kirsch, K., and Bell, A., 2013. *Ground Improvement Third Edition*. (K. Kirsch and A. Bell, eds.), CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Krishna, B.L., Singh, A.N., Patra, S., and Dubey, V.K., 2011. Purification, characterization and immobilization of urease from *Momordica charantia* seeds. *Process Biochemistry*, 46 (7), 1486–1491.
- Lee, S., & Kim, J., 2020. An experimental study on enzymatic-induced carbonate precipitation using yellow soybeans for soil stabilization. *KSCE Journal of Civil Engineering*, 24(7), 2026-2037.
- Maroney, M., and C. S., 2014. Nonredox Nickel Enzymes, *Chem. Rev.* 114, 4206–4228.
- Martin, R.I., and Brown, P.W., 1995. Mechanical properties of hydroxyapatite formed at physiological temperature. *Journal of Materials Science, Materials in Medicine* 6, 138–143.
- Miftah A, Khodadadi H and Bilsel H., 2019. Strengthening beach sand by enzyme induced calcium carbonate precipitation. 8th Geotechnical Symposium Conf., pp 1–9
- Nam, I. H., Chon, C. M., Jung, K. Y., Choi, S. G., Choi, H., & Park, S. S., 2015. Calcite precipitation by ureolytic plant (*Canavalia ensiformis*) extracts as effective biomaterials. *KSCE Journal of Civil Engineering*, 19(6), 1620-1625.
- Neupane, D., Yasuhara, H., Kinoshita, N., & Unno, T., 2013. Applicability of enzymatic calcium carbonate precipitation as a soil-strengthening technique. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 139(12), 2201-2211.
- Nicholson, P. G., 2014. *Soil Improvement and Ground Modification Methods*. Butterworth-Heinemann, 368, USA.
- Oliveira, P.J.V., Freitas, L. D., ve Carmona, J. P. S. F., 2016. Effect of Soil Type on the Enzymatic Calcium Carbonate Precipitation Process Used for Soil Improvement. *Soils and Foundations*, 52(3), 539-549.
- Öktem, H., 2012. Optimum process conditions on shrinkage of an injected-molded part of DVD-ROM cover using Taguchi robust method. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 61(5-8), 519-528.
- Özaydın, K., 1989. *Zemin Mekaniği*. Meya Matbaacılık ve Yayıncılık, 395, İstanbul.

- Özaydın, K., 2012. Zeminlerin İyileştirilmesi. Zemin Mekaniği ve Temel Mühendisliği Ondördüncü Ulusal Kongresi.
- Özen, E. S., 2019. Kumlu Zeminlerin Geoteknik Özelliklerinin İyileştirilmesinde Doymamış Polyester Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi, Konya Teknik Üniversitesi, Konya, Türkiye.
- Park, S. S., Choi, S. G., & Nam, I. H., 2014 . Effect of plant-induced calcite precipitation on the strength of sand. *Journal of Materials in Civil Engineering*, 26(8), 06014017.
- Putra, H., Yasuhara, H., Kinoshita, N., Erizal., ve Sudibyo, T., 2018. Improving Shear Strength Parameters of Sandy Soil using Enzyme-Mediated Calcite Precipitation Technique. *Civil Engineering Dimension*.
- Putra, H., Yasuhara, H., Kinoshita, N., Neupane, D., & Lu, C. W., 2016. Effect of magnesium as substitute material in enzyme-mediated calcite precipitation for soil-improvement technique. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 4, 37.
- Putra, H., Yasuhara, H., Kinoshita, N., & Hirata, A., 2017a. Optimization of enzyme-mediated calcite precipitation as a soil-improvement technique: The effect of aragonite and gypsum on the mechanical properties of treated sand. *Crystals*, 7(2), 59.
- Putra, H., Yasuhara, H., ve Kinoshita, N., 2017b. Optimum condition for the application of enzyme-mediated calcite precipitation technique as soil improvement method. *Int. J. Adv. Sci. Eng. Inf. Technol.*, 7, 2145–2151.
- Ross, M. J., 2018. Application of EICP for Soil Improvement for Finer-Grained Soils. M.D. Thesis, Arizona State University, Phoenix, AZ, USA.
- Ryan, T. P., 1988. Taguchi's Approach to Experimental Design. *Quality Progress*, 1, 34.
- Saif, A., Cuccurullo, A., Gallipoli, D., Perlot, C., & Bruno, A. W., 2022. Advances in Enzyme Induced Carbonate Precipitation and Application to Soil Improvement: A Review. *Materials*, 15(3), 950.
- Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M. H., Kirchmann, H., & Kandeler, E., 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and environmental microbiology*, 67(9), 4215-4224.
- Sirko, A., Brodzik, R., 2000. Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim Pol*, 47, 1189-1195.
- Sumner, JB., 1926. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J Biological Chemistry*, 69, 435-441.
- Şirvancı, M., 1997. Kalite İçin Deney Tasarımı "Taguchi Yaklaşımı". İstanbul: Literatür Yayıncılık.
- Takatsu, M., Nadeeka, R., Kawasaki, S., 2016. Development of biogrouting using plant-derived urease and calcium phosphate compound. In *Proceedings of the 50th US Rock Mechanics/Geomechanics Symposium*, Huston, TX, USA, 26–29 .
- Tunçel M., U., 2018. Polipropilen Lif ve Kevlar Katkılı Yol Betonlarının Taguchi Yöntemi Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- van Paassen, L. A., 2009. Biogrout, ground improvement by microbial induced carbonate precipitation. (Doctoral dissertation), TU Delft, Delft University of Technology.
- van Paassen, L., Ghose, R., van der Linden, T., van der Star, W., and van Loosdrecht, M. 2010a. Quantifying Biomediated Ground Improvement by Ureolysis: LargeScale BiogroutExperiment .J. Geotech. Geoenviron. Eng., 136(12), 1721-1728.

- van Paassen, L., Daza, C., Staal, M., Sorokin, D., van der Zon, W., and van Loosdrecht, M. 2010b. Potential Soil Reinforcement by Biological Denitrification. *Ecological Engineering*, 36(2), 168-175.
- Wang, D., Ma, W., Niu, Y. Chang, X. and Wen, Z., 2007. Effects of cyclic freezing and thawing on mechanical properties of Qighai-Tibet clay. *Cold Region and Science Technology*, Vol. 48, Sf. 34-43.
- Whiffin, V.S., Van Paassen, L.A., Harkes, M.P., 2007. Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. *Geomicrobiol. J.*, 24, 417–423.
- Yang, P., O'Donnell, S., Hamdan, N., Kavazanjian, E., & Neithalath, N., 2016. 3D DEM Simulations of Drained Triaxial Compression of Sand Strengthened Using Microbially Induced Carbonate Precipitation. *International Journal of Geomechanics*, 17(6), 04016143.
- Yasuhara, H., Neupane, D., Hayashi, K., ve Okamura, M., 2012. Experiments an Predictions of Physical Properties of Sand Cemented by Enzymatically-induce Carbonate Precipitation. *Soils and Foundations*, 52(3), 539-549.
- Yıldırım, N., Gürtuğ, Y., & Sesal, C. 2016. Mikrobiyal kalsiyum karbonat oluşum mekanizmaları ve uygulama alanları. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, (2), 70-80.
- Zhao, Z., Hamdan, N., Shen, L., Nan, H., Almajed, A., Kavazanjian, E., & He, X., 2016. Biomimetic hydrogel composites for soil stabilization and contaminant mitigation. *Environmental science & technology*, 50(22), 12401-12410.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Hamayoun SAKHAI
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Abdul Wadood Lisesi/ Takhar/ Afganistan
Lisans:	Bartın Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, İnşaat Müh.
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Geoteknik Anabilim Dalı (2022)
Doktora:	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Farsça :	Anadili
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	